

**AKUTE TRANSPLANTATABSTOßUNG:
MÖGLICHKEITEN DER IMMUNMODULA-
TORISCHEN THERAPIE MIT
3-DEAZAADENOSIN (C3ADO) SOWIE
EINSATZ DER ODN-DECOY-TECHNOLOGIE**

HORST FINGERHUTH

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2006

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2006

© 2006 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

**Akute Transplantatabstoßung:
Möglichkeiten der immunmodulatorischen Therapie
mit 3-Deazaadenosin (c3Ado) sowie
Einsatz der ODN-Decoy-Technologie**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

HORST FINGERHUTH

Aus dem Institut für Veterinärphysiologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuer: Prof. Dr. Rüdiger Gerstberger
und
dem Zentrum für Innere Medizin, Abteilung Kardiologie
und Angiologie des Uniklinikums Gießen
Betreuer: PD Dr. Hans Hölschermann

**Akute Transplantatabstoßung:
Möglichkeiten der immunmodulatorischen Therapie
mit 3-Deazaadenosin (c3Ado) sowie
Einsatz der ODN-Decoy-Technologie**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

HORST FINGERHUTH
Tierarzt aus Neustadt / Weinstraße (Rheinland-Pfalz)

Gießen 2006

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. M. Reinacher

Gutachter: Prof. Dr. R. Gerstberger
PD Dr. H. Hölschermann

Tag der Disputation: 07.09.2006

Erklärung:

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	- 1 -
1 Einleitung.....	- 1 -
1.1 Einleitung	- 1 -
1.2 Die Bedeutung der Herztransplantation	- 1 -
1.3 Formen der Transplantatabstoßung	- 2 -
1.4 Die Pathomechanismen der Transplantatabstoßung	- 4 -
1.4.1 Die Fremderkennung	- 4 -
1.4.2 Kostimulation	- 5 -
1.4.3 Transkriptionsfaktoren	- 7 -
1.4.4 Die Transkriptionsfaktoren STAT-1 und AP-1	- 8 -
1.4.4.1 Signal transducer and activator of transcription-1	- 8 -
1.4.4.2 Activation protein-1	- 9 -
1.5 Adhäsionsmoleküle	- 10 -
1.6 Cytokine und Chemokine	- 12 -
1.7 Effektormechanismen der akuten Transplantatabstoßung.....	- 13 -
1.8 Die Erforschung der Transplantatabstoßung durch den Einsatz von Tiermodellen.....	- 14 -
1.9 Therapeutische Ansätze zur Modulation der akuten Abstoßung	- 16 -
1.9.1 3-Deazaadenosin (c3Ado)	- 17 -
1.9.2 Inhibition der Transkriptionsfaktoren STAT-1 und AP-1	- 19 -
1.10 Ziel der Studie	- 21 -
2 MATERIAL UND METHODEN	- 22 -
2.1 Materialliste	- 22 -
2.1.1 Verwendete Puffer	- 24 -
2.2 Tierexperimenteller Teil.....	- 24 -
2.2.1 Versuchstiere.....	- 24 -
2.2.1.1 Herkunft der Tiere.....	- 24 -
2.2.1.2 Tierversuchsgenehmigung	- 24 -

2.2.1.3	Tierhaltung.....	- 25 -
2.2.2	Herztransplantation.....	- 25 -
2.2.2.1	Narkose	- 25 -
2.2.2.2	Operationsvorbereitung	- 25 -
2.2.2.3	Operatives Vorgehen.....	- 26 -
2.2.2.3.1	Vorbereitung des Empfängertieres.....	- 26 -
2.2.2.3.2	Entnahme des Transplantats.....	- 26 -
2.2.2.3.3	Transplantation.....	- 26 -
2.2.2.3.4	Blutflußrichtung im Transplantat.....	- 27 -
2.2.3	Postoperatives Monitoring	- 28 -
2.2.3.1	Transplantatfunktion	- 28 -
2.2.4	Gruppendesign	- 29 -
2.2.4.1	Studie 1: Akute Transplantatabstoßung und c3Ado	- 29 -
2.2.4.2	Studie 2: Akute Transplantatabstoßung und Inhibition der Transkriptionsfaktoren STAT-1 und AP-1	- 29 -
2.3	Technik der Asservation	- 32 -
2.4	Histologische Aufarbeitung	- 32 -
2.4.1	Standardfärbung.....	- 32 -
2.4.2	Immunhistochemische Färbung.....	- 33 -
2.5	Molekularbiologische Untersuchungen.....	- 37 -
2.5.1	Quantifizierung von mRNA durch die semi-quantitative Reverse- Transskriptase (RT) Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR):	- 37 -
2.5.1.1	RNA Isolierung	- 37 -
2.5.1.2	Bestimmung der RNA-Konzentration.....	- 37 -
2.5.1.3	Herstellung der cDNA (copy-DNA)	- 38 -
2.5.2	Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	- 38 -
2.5.2.1	Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA- Fragmenten.....	- 40 -
2.6	Nachweis von Apoptose	- 41 -
2.6.1	DNA-Laddering	- 41 -
2.6.2	TUNEL-Assay	- 41 -
2.7	Auswertung	- 42 -
2.7.1	Funktion des Transplantats	- 42 -
2.7.2	Immunhistochemische Auswertung	- 42 -

2.7.2.1	Adhäsionsmoleküle	- 43 -
2.7.2.2	Zelluläre Infiltration	- 43 -
2.7.3	Semiquantitative RT-PCR.....	- 43 -
2.7.3.1	Verwendung von PBGD als Standardgen	- 44 -
2.7.4	Nachweis der Apoptose.....	- 45 -
2.8	Statistische Methodik	- 45 -
2.8.1	Verwendete Testverfahren	- 45 -
3	Ergebnisse.....	- 46 -
3.1	Das Tiermodell	- 46 -
3.1.1	Histologische, immunhistochemische und molekularbiologische Charakterisierung des akuten Abstoßungsmodelles.....	- 47 -
3.1.2	Immunhistochemie.....	- 48 -
3.1.3	Molekularbiologische Untersuchungen	- 50 -
3.2	Modulation der akuten Transplantatabstoßung mit der immunmodulatorischen Substanz c3Ado	- 52 -
3.2.1	Versuchstiere.....	- 52 -
3.2.2	Transplantatüberleben	- 54 -
3.2.3	Immunhistochemie.....	- 55 -
3.2.3.1	Adhäsionsmoleküle	- 55 -
3.2.3.2	Zelluläre Infiltration	- 59 -
3.2.4	Molekulbiologische Untersuchungen	- 64 -
3.2.4.1	RT-PCR.....	- 64 -
3.2.4.1.1	Adhäsionsmoleküle	- 64 -
3.2.4.1.2	Cytokine und Chemokine	- 66 -
3.2.5	Nachweis der Apoptose.....	- 69 -
3.2.5.1	TUNEL-Reaktion	- 69 -
3.2.5.2	DNA-Laddering.....	- 70 -
3.3	Modulation der akuten Transplantatabstoßung durch den Einsatz von STAT-1- und AP-1-ODN-Decoys	- 72 -
3.3.1	Versuchstiere.....	- 72 -
3.3.2	Transplantatüberleben.....	- 74 -
3.3.3	Nachweis der fluoreszenzmarkierten Decoys im Transplantatgewebe	- 76 -
3.3.4	Immunhistochemie.....	- 77 -

3.3.4.1	Adhäsionsmoleküle	- 77 -
3.3.4.2	Zelluläre Infiltration	- 81 -
3.3.5	Molekularbiologische Untersuchungen	- 87 -
3.3.5.1.1	Adhäsionsmoleküle	- 87 -
4	Diskussion.....	- 91 -
4.1	Die Wahl des Transplantationsmodelles	- 92 -
4.2	Die Immunmodulation mit c3Ado	- 93 -
4.3	Die Immunmodulation durch den Einsatz von STAT-1- und AP-1-Decoys	- 96 -
4.4	Ausblick.....	- 100 -
	Literaturverzeichnis	- 102 -
5	Zusammenfassung	- 113 -
6	Summary.....	- 116 -
7	Danksagung	-118 -

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Das Prinzip der Kostimulation	- 6 -
Abb. 2: Die trans-Kostimulation	- 7 -
Abb. 3: Schematische Wirkungsweise eines Transkriptionsfaktors	- 8 -
Abb. 4: Das beispielhafte Zusammenspiel der Adhäsionsmoleküle	- 12 -
Abb. 5: Das heterotop transplantierte Herz	- 15 -
Abb. 6: Die Wirkung von c3Ado auf den Methylierungszyklus	- 18 -
Abb. 7: Chirurgische Technik der heterotopen Herztransplantation	- 27 -
Abb. 8: Die Blutflußrichtung im Transplantat	- 28 -
Abb. 9: Wirkungsprinzip der Decoy-Technologie	- 30 -
Abb. 10: Das Prinzip der Immunhistochemie mit der APAAP-Methode	- 34 -
Abb. 11: Die palpierbare Herzaktion der Transplantate	- 46 -
Abb. 12: Transplantatüberleben bei unbehandelten Tieren (Tage post OP)	- 47 -
Abb. 13: Die zelluläre Infiltration im Zeitverlauf der akuten Abstoßung	- 48 -
Abb. 14: Charakterisierung der zellulären Infiltration der Transplantate	- 49 -
Abb. 15: Die relative mRNA-Konzentrationen von ICAM-1 und VCAM-1 im Gesamtlysat	- 50 -
Abb. 16: Die relative mRNA-Konzentrationen von IL-2 und MCP-1 im Gesamtlysat	- 51 -
Abb. 17: Die mittlere Ischämiezeit der Transplantate (c3Ado)	- 52 -
Abb. 18: Das mittlere Gewicht der Tiere (c3Ado)	- 53 -
Abb. 19: Das Transplantatüberleben in Prozent (c3Ado)	- 54 -
Abb. 20: Immunhistochemie c3Ado ICAM-1 (Bilder)	- 56 -
Abb. 21: Immunhistochemie c3Ado ICAM-1	- 57 -
Abb. 22: Immunhistochemie c3Ado VCAM-1	- 58 -
Abb. 23: Immunhistochemie c3Ado MHC II positive Zellen	- 60 -
Abb. 24: Immunhistochemie c3Ado ED 1 (Bilder; Monozyten/Makrophagen)	- 61 -
Abb. 25: Immunhistochemie c3Ado ED-1 (Monozyten/Makrophagen)	- 62 -
Abb. 26: Immunhistochemie c3Ado R73 (T-Zellen)	- 62 -
Abb. 27: Immunhistochemie c3Ado iNOS positive Zellen	- 63 -
Abb. 28: Die PCR-Produkte im direkten Vergleich (Beispiel ICAM-1 Tag1)	- 64 -
Abb. 29: RT-PCR c3Ado Adhäsionsmoleküle	- 65 -
Abb. 30: RT-PCR c3Ado IL-2	- 67 -

Abb. 31: RT-PCR c3Ado MCP-1	- 68 -
Abb. 32: Nachweis der Apoptose durch die TUNEL-Reaktion	- 69 -
Abb. 33: Quantifizierung der Apoptoserate in den Transplantaten	- 70 -
Abb. 34: Nachweis der Apoptose auf molekularer Ebene	- 71 -
Abb. 35: Das Transplantatüberleben der unbehandelten Kontrollgruppen	- 72 -
Abb. 36: Das mittlere Gewicht der Tiere (ODN)	- 73 -
Abb. 37: Transplantatüberleben in Prozent (ODN)	- 75 -
Abb. 38: Nachweis der markierten Decoys in den Transplantaten	- 76 -
Abb. 39: Immunhistochemie ODN ICAM-1 (Bilder)	- 78 -
Abb. 40: Immunhistochemie ODN ICAM-1	- 79 -
Abb. 41: Immunhistochemie ODN VCAM-1	- 80 -
Abb. 42: Immunhistochemie ODN MHC II positive Zellen	- 81 -
Abb. 43: Immunhistochemie ODN ED-1 (Monozyten/Makrophagen)	- 82 -
Abb. 44: Immunhistochemie ODN ED-1 (Monozyten/Makrophagen)	- 83 -
Abb. 45: Immunhistochemie ODN R73 (T-Zellen)	- 84 -
Abb. 46: Immunhistochemie ODN R73 (T-Zellen)	- 85 -
Abb. 47: Immunhistochemie ODN iNOS positive Zellen	- 86 -
Abb. 48: Die PCR-Produkte von ICAM-1 und VCAM-1 am Tag 3	- 87 -
Abb. 49: RT-PCR ODN ICAM-1	- 88 -
Abb. 50: RT-PCR ODN VCAM-1	- 89 -
Abb. 51: Die PCR-Produkte von ICAM-1 und VCAM-1 am Tag 3	- 90 -

Abkürzungsverzeichnis

STAT-1	Signal transducer and activator of transcription-1
AP-1	Activation protein-1
OP	Operation
EKG	Elektrokardiogramm
TVP	Transplantatvaskulopathie
HLA	Human leucocyte antigen
MHC	Major histocompatibility complex
APZ	Antigen präsentierende Zelle
IL-2	Interleukin-2
ERK	Extracellular signal-related kinase
NF-AT	Nuclear factor AT
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
IFN- γ	Interferon γ
JAK	Januskinase
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule-1
ATF	Aktivierungsfaktor
Ig	Immunglobulin
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule
TNF	Tumor necrosis factor
MCP-1	Macrophage chemoattractant protein
DNA	Desoxyribonukleinsäure
NO	Stickstoffmonoxyd
iNOS	Induzierbare NO-Synthetase
CsA	Cyclosporin A
c3Ado	3-Deazaadenosin
LPS	Lipopolysaccharid
ROS	Reaktive Sauerstoffradikale
ODN	Oligodesoxynukleotide
NF- κ B	Nuclear factor- κ B
LEW	Lewis
WF	Wistar

NaCL	Natriumchlorid
s.c.	<i>Subcutan</i>
PCR	Polymerase chain reaction
Cons	Consensus
Mut	Mutiert
TCR	T-cell receptor
APAAP	Alkalische Phosphatase- anti alkalische Phosphatase
RT	Reverse transcriptase
cDNA	Copy DNA
PBS	Phosphat gepufferte Saline
UV	Ultraviolett
H&E	Hämalaun und Eosin
Vs	<i>Versus</i>
n.s.	nicht signifikant
KGW	Körpergewicht
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyltransferase dUTP nick-end labeling
IRF	IFN regulatory factor

1 Einleitung

1.1 Einleitung

Im Dezember 1967 führte Christian Barnard erfolgreich die erste orthotope Herztransplantation beim Menschen durch. Die Abstoßung des Transplantates konnte durch die Immunsuppression des Empfängers verhindert werden und der Patient überlebte 18 Tage. Er erkrankte postoperativ unter der Immunsuppression an einer Lungenentzündung. Dies zeigte bereits eines der großen Probleme der Transplantationsmedizin: Auf der einen Seite muss man zur Verhinderung der Abstoßung des Transplantates das Immunsystem des Empfängers unterdrücken; auf der anderen Seite besteht dadurch immer die Gefahr einer Infektion des immunsupprimierten Patienten. Bereits im Januar des folgenden Jahres kam es zur zweiten Herztransplantation. Hier hat Barnard die Operation mit einer leicht modifizierten Technik vorgenommen und der Transplantatempfänger konnte nach einer Zeit intensiver Nachbehandlung in ein relativ normales Leben aus dem Krankenhaus entlassen werden. Der zweite Patient überlebte 19 Monate. In der Autopsie zeigte sich im Transplantat eine konzentrische Intimaproliferation und eine Verkalkung der Gefäße, ähnlich einer Atherosklerose, die heute als sog. Transplantatvasculopathie oder auch als chronische Abstoßung bezeichnet wird. Die Transplantatvasculopathie stellt in der aktuellen Transplantationsmedizin einen der Hauptgründe für den Transplantatverlust dar (Zur Übersicht: [1]).

Seit diesen Anfängen der Herztransplantation kam es zur ständigen Weiterentwicklung der immunsuppressiven Protokolle, immer unter der Berücksichtigung einer ausreichenden Immunsuppression zur Verhinderung der Abstoßung ohne die Gefährdung des Patienten durch Infektionen. Ermöglicht wurde dies durch ein immer tiefer greifendes Verständnis der Pathomechanismen der Transplantatabstoßung.

1.2 Die Bedeutung der Herztransplantation

Laut des Registers der Internationalen Gesellschaft für Herz- und Lungentransplantation wurden bis zum Jahre 2004 in den weltweit an der Registrierung teilnehmenden Transplantationszentren ca. 60.000 Herztransplantationen vorgenommen. Dies zeigt, dass sich die Herztransplantation als Behandlungsoption für Patienten mit terminalem Organversagen etabliert hat. Bei den Erkrankungen bilden die idiopathische und die ischämische Kardiomyopathie mit jeweils ca. 45% den Hauptanteil der Indikation zur

Transplantation. Es gibt zur Transplantation von soliden Organen mehrere Alternativen. Teilweise besteht bei einigen Organen die Möglichkeit des technischen Ersatzes wie z.B. die Dialyse bei Nierenversagen. Für einige Organe gibt es bereits einen kompletten künstlichen Ersatz, wie z.B. Kunstherzen. Im Vergleich zu diesen Alternativen stellt aber die Transplantation eine Erhöhung der Lebensqualität dar. So gaben fast 90% der Transplantatempfänger an, über eine uneingeschränkte Lebensqualität zu verfügen und weitere fast 10% gelten nur als leicht eingeschränkt [2].

Ob es statistisch im Vergleich zu den heutigen konventionellen Therapien zu einer Verbesserung der Überlebensrate im Langzeitverlauf kommt, wird diskutiert, da umfassende Studien darüber noch ausstehen. Die Studie von Mario Deng [3] bewies aber, dass sich zumindest bei den sog. Hoch-Risiko-Patienten die Überlebensrate im ersten Jahr durch die Transplantation verbessert.

Studiert man die Statistiken zur Herztransplantation, so wird deutlich, dass die Mortalität bei Transplantatempfängern im ersten Jahr am höchsten ist. Die wichtigsten Todesursachen in dieser Periode sind in den ersten 30 Tagen operative Komplikationen und in den folgenden 11 Monaten die akute Abstoßung des Transplantates [4]. Durch die Verbesserung der immunsuppressiven Protokolle können diese akuten Abstoßungsperioden immer besser beherrscht werden. Trotzdem besteht immer noch ein großer Forschungsbedarf, da nicht zuletzt akute Abstoßungsperioden zusätzlich als prädisponierend für die chronische Transplantatdysfunktion gelten.

Daher ist für die Behandlung der Transplantate die strikte Trennung der akuten und der chronischen Abstoßung weder vollständig möglich noch sinnvoll und ein tief reichendes Verständnis der pathologischen und immunologischen Vorgänge ist für die Entwicklung neuer therapeutischer Strategien unerlässlich.

1.3 Formen der Transplantatabstoßung

Unter der Transplantatabstoßung versteht man die Summe der immunologischen Phänomene, die zur Zerstörung des Transplantates führen. Es gibt mehrere Einteilungen der Abstoßung. Klinisch wird je nach Zeitpunkt des Auftretens, der Progressivität und nach der spezifischen Art des Schadens unterschieden:

1. Hyperakute oder akzelerierte Abstoßung
2. Akute Abstoßung
3. Chronische Transplantatdysfunktion

Zu 1.: Bei bereits sensibilisierten Empfängern kann es zu einer hyperakuten oder akzelerierten Abstoßung des Organs kommen. Durch die Sensibilisierung des Empfängers kommt es zu einer B- und T-Zell vermittelten Immunantwort, bei der die präformierten Antikörper die endothelialen Antigene des Spenders neutralisieren. Daher kommt es bei der hyperakuten Abstoßung innerhalb von Minuten (z.B. bei einer Xenotransplantation) oder bei der akzelerierten Abstoßung nach Stunden (z.B. durch die vorangegangene Sensibilisierung durch eine Schwangerschaft) zu Abstoßungsprozessen. Dabei stehen Haemorrhagien und thrombotische Verschlüsse der Anastomosen klinisch im Vordergrund.

Zu 2.: Die akute Abstoßung tritt ohne immunsuppressive Therapie klassischerweise in ihrem Vollbild nach 5-7 Tagen auf. Klinisch stehen die Symptome des Organversagens im Vordergrund. In der kardiologischen Transplantationsmedizin bedeutet dies die Ausbildung von Zeichen des progredienten Herzversagens, wie z.B. die Dyspnoe des Patienten durch die Ausprägung eines Lungenödems. Im EKG kann man eine Niedervoltage finden und in der Echographie sieht man eine Zunahme der Wanddicke, eine Linksherzdilatation und eine Einschränkung der Pumpfunktion. Zum Abstoßungsmonitoring und zur Diagnosesicherung werden Myokardbiopsien vorgenommen. Bei der histologischen Untersuchung der Biopate kann man hauptsächlich eine progrediente, zelluläre Infiltration feststellen, die primär aus T-Zellen, aber auch aus anderen immunkompetenten Zellen besteht. Diese Zellen vermitteln die Schädigung des Parenchyms und der Endothelzellen, was zu einer verminderten Perfusion bis hin zu Infarkten des Transplantatgewebes führt.

Zu 3.: Die chronische Abstoßung, besser als chronische Transplantatdysfunktion bezeichnet, tritt klassisch erst im Langzeitverlauf nach Herztransplantation auf und ist histologisch primär gekennzeichnet durch eine langsam voranschreitende konzentrische, neointimale Proliferation, die zum Verschluss der Koronarien führt. Diesen diffusen Prozess bezeichnet man als Transplantatvasculopathie (TVP) [5]. Ein weiterer Aspekt der chronischen Transplantatdysfunktion ist die Ausbildung einer parenchymalen Atrophie und einer interstitiellen Fibrose. Die Drei-Jahres-Inzidenz der TVP liegt zwischen 36% und 44%. Man vermutet nach dem „response to injury“-Modell der chronischen Abstoßung, dass die Proliferationen ihre Ursache in vorangegangenen Mikroläsionen finden [5]. Es gibt Hinweise darauf, dass diese initialen Schäden in akuten Abstoßungsperioden entstehen können. Diese akuten Abstoßungsperioden werden in einigen Studien in deren Anzahl und Schwere mit dem Erscheinen der

Transplantatvasculopathie in Verbindung gebracht [6] [7] [8] [9] [10].

1.4 Die Pathomechanismen der Transplantatabstoßung

Allgemein werden die Risikofaktoren der akuten Abstoßung in alloantigen-unabhängige und alloantigen-abhängige eingeteilt:

Zu den alloantigen-unabhängigen Faktoren zählen unter anderem der Hirntod des Spenders, der Ischämie- und Reperfusionsschaden sowie die Konservierung des Transplantates.

Im Zentrum der alloantigen-abhängigen Faktoren, mit denen sich diese Studie hauptsächlich befasst, steht das MHC-System (beim Menschen auch als HLA (human leukocyte antigen) benannt). Es liefert den ersten Ansatz zur Fremderkennung.

1.4.1 Die Fremderkennung

Am Anfang des Abstoßungsprozesses steht die Fremderkennung des Transplantates anhand der Alloantigene. Hierbei handelt es sich um Glykoproteine, die sich bei den einzelnen Individuen unterscheiden. Die bekanntesten sind die Blutgruppenantigene des AB0- und des Rhesus-Systems. Bei der Transplantation solider Organe wird die Fremderkennung durch die Aktivierung der T-Zellen durch die „major histocompatibility complex (MHC)“-Moleküle auf der Oberfläche des Spenderorganes vermittelt [11] [12]. Bei diesen Komplexen handelt es sich um hochpolymorphe Zelloberflächenproteine, die nur bei eineiigen Zwillingen und bei Inzuchttieren gleich sind. Das Wissen über diese Moleküle und der Versuch, die MHC-Moleküle des Spenders und des Empfängers aufeinander abzustimmen, konnten die Erfolgsrate der Transplantation signifikant steigern.

Die physiologische Bedeutung dieser polymorphen Genprodukte liegt in der Präsentation pepiderger Antigene, damit diese von entsprechenden T-Zell Rezeptorproteinen erkannt werden können. Die MHC-Komplexe besitzen eine breit gefächerte Spezifität für Peptide, so dass sie mehrere verschiedene Peptide binden können. Sie gehen aber zur selben Zeit immer nur mit einem Peptid eine Bindung ein, die aufgrund der hohen Affinität über einen ausreichend langen Zeitraum besteht, um die Erkennung durch die T-Zellen zu ermöglichen. Die Moleküle der Klasse I (MHC I) sind auf allen kernhaltigen Zellen sowie Thrombozyten zu finden; sie präsentieren intrazellulär verarbeitete Antigene den CD8⁺ T-Zellen [13]. Die MHC-II Moleküle befinden sich in der Membran von mononukleären Phagozyten und B-Lymphozyten, welche die Antigene über Endozytose aufnehmen und den CD4⁺ T-Zellen, eingebettet im MHC-II-

Komplex, präsentieren [14].

Man kann die direkte und die indirekte Erkennung der so genannten Alloantigene unterscheiden [15].

Bei der direkten Fremderkennung werden die antigen präsentierende Zellen (APZ) des Spenders, die als sog. „Passagier-Leukozyten“ mittransplantiert werden, von den T-Zellen des Empfängers als fremd erkannt. Dies erfolgt über die Erkennung der MHC-Komplexe auf den APZ durch die T-Zell-Rezeptoren. Dies ist möglich, da die allogenen MHC-Moleküle den „eigenen“ des Empfängers zum einen in ihrer Struktur ähneln und so an die T-Zellen binden können. Da sie aber auf der anderen Seite von den MHC-Komplexen des Empfängers abweichen, werden sie dann als „fremde“ allogene Moleküle erkannt und die T-Zelle wird aktiviert.

Bei dem indirekten Weg werden Allopeptide, d.h. Proteinstrukturen des Spenders von APZ des Empfängers erkannt und in die Zelle aufgenommen. Nach der intrazellulären Verarbeitung dieser Peptide werden diese in den eigenen MHC-Komplexen eingebettet und an die Zelloberfläche gebracht, um dort zur weiteren Aktivierung des Immunsystems den T-Zellen präsentiert zu werden. Nur in Kombination mit dem eigenen MHC-Komplex ist die T-Zelle imstande, die fremden Peptide zu erkennen und aktiviert zu werden.

1.4.2 Kostimulation

Zur vollständigen Aktivierung von T-Zellen ist neben dem MHC-vermittelten und Antigen-abhängigen ersten Signal ein weiteres sog. Kostimulationssignal notwendig. Wird eine T-Zelle nur durch das erste Signal stimuliert, kommt es nicht zur Aktivierung, sondern die T-Zelle verfällt in den Zustand der Anergie [16] [17] [18] [19]. In diesem Zustand sind lebende T-Zellen nicht in der Lage, auf einen optimalen Antigenreiz mit der Produktion von IL-2 und einer Expansion zu reagieren. In diesen Zellen kommt es auch nicht zur sonst erwarteten Aktivierung einer Reihe von für die Induktion der Abstoßungskaskade entscheidenden Transkriptionsfaktoren wie z.B. ERK, NF-AT oder AP-1 [18]. Die Kostimulation erfolgt durch Rezeptor-Liganden-Paare wie z.B. das CD-28-Molekül auf den T-Zellen des Empfängers und dem dazugehörigen Partner, dem B7 (B7-1, oder B7-2) Molekül auf den APZ. Einen weiteren wichtigen Schritt zur vollständigen Aktivierung der T-Zellen stellt die Interaktion des CD40 Moleküls mit seinem Liganden, dem CD40L (oder CD154) dar. CD40L ist ein Mitglied der „Tumor necrosis factor“ Familie und die Expression dieses Moleküls auf der Oberfläche der T-Zellen wird unmittelbar nach Aktivierung des T-Zell

Rezeptors hochreguliert [20]. Die Interaktion von CD40 und CD40L spielt eine zentrale Rolle für die Immunantwort durch den Einfluss auf die Hochregulation der Kostimulationsmoleküle, die für die Proliferation und die Differenzierung der T-Zellen notwendig sind, so dass eine Blockade der CD40/CD40L-Interaktion konsequenterweise in der Anergie der T-Zellen endet [21](siehe Abb. 1).

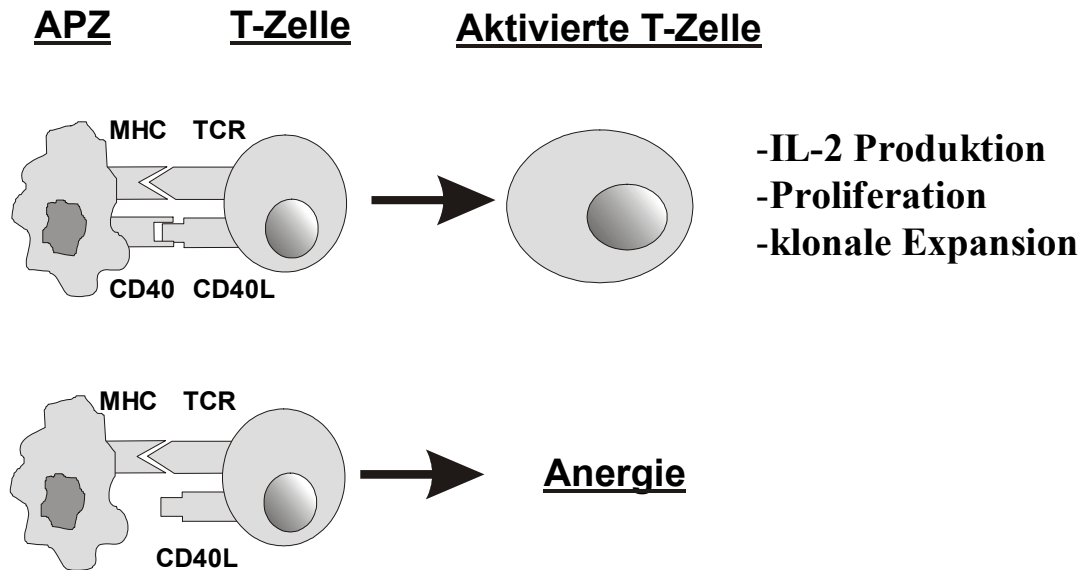


Abb. 1: Das Prinzip der Kostimulation: Nur wenn die T-Zelle durch die antigen präsenternde Zelle (APZ) sowohl von dem sog. „ersten Signal“, das vom MHC-Komplex präsentiert und von dem T-Zell-Rezeptor (TCR) erkannt wird, als auch von dem kostimulatorischen Signal („zweites Signal“; hier als Beispiel das CD40, welches mit dem CD40L auf der T-Zelle interagiert) aktiviert wird, kommt es zur vollständigen Stimulation der Zelle (obere Zeile). Fehlt das kostimulatorische Signal, verfällt die T-Zelle in den Zustand der Anergie, d.h., die Produktion von Botenstoffen (z.B. IL-2) und die weitere Proliferation und Expansion der T-Zellen entfallen (untere Zeile).

Die Blockade der Kostimulation führte in Tierexperimenten zu einer Verlängerung des Transplantatüberlebens, bzw. konnte dadurch ein Langzeittransplantatüberleben (d.h. Überleben des Transplantates bis Studienende) induziert werden [22] [23] [24] [25]. Folgestudien haben gezeigt, dass der Erfolg der Inhibition der Kostimulation von dem zu transplantierenden Organ und im Speziellen von der Anzahl der im Organ vorhandenen APZ abhängig ist [25]. Auch der Einsatz spezifischer Antikörper gegen CD40L in Transplantationsmodellen scheint sehr vielversprechend [26].

Neben dieser gegenseitigen Stimulation nur zweier Zellarten (*cis*-Stimulation) hat man in den letzten Jahren auch die Bedeutung der Kostimulation über dritte Zellen erkannt

(*trans*-Stimulation). Hierbei kommt das kostimulatorische Signal nicht direkt von der APZ, sondern die Interaktion mit einer dritten Zelle (z.B. Endothelzellen oder dendritische Zellen) führt zur vollständigen Stimulation oder weiter reichenden Aktivierung der T-Zelle (siehe Abb. 2).

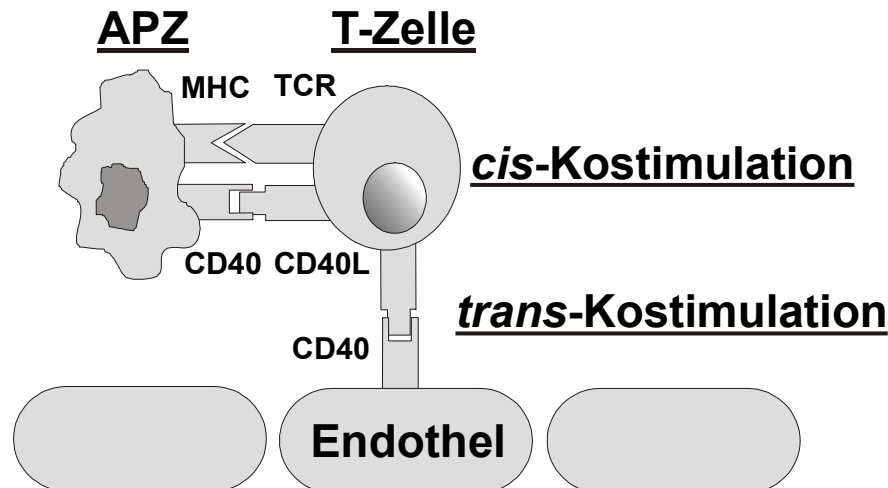


Abb. 2: Die *trans*-Kostimulation: Das kostimulatorische Signal (hier als Beispiel CD40/CD40L) kann nicht nur zusammen mit dem sog. „ersten Signal“ (MHC/TCR Interaktion) von der antigen präsentierenden Zelle (APZ) vermittelt werden (*cis*-Kostimulation, siehe Abb. 1), sondern auch andere Zellen, wie z.B. Endothelzellen können über die sog. *trans*-Kostimulation den Aktivierungsgrad der T-Zelle beeinflussen.

Mandelbrot konnte 2001 nachweisen, dass die alleinige *trans*-Kostimulation ebenso effektiv T-Zellen aktivieren kann wie die Kostimulation in *cis* [27].

Auf Endothelzellen kann es, cytokin-vermittelt, zu einer starken Erhöhung der sonst nur schwach vorhandenen CD40 Expression kommen [28]. Diese erhöhte Expression von CD40 konnte in Transplantatbiopsien auf den Endothelzellen der Gefäße und auf den infiltrierenden Leukozyten nachgewiesen werden [29].

Bei vollständiger Aktivierung der T-Zellen kommt es zur Produktion einer Reihe von Cytokinen und Chemokinen, die die Abstoßungskaskade induzieren. Die intrazelluläre Signaltransduktion dieser Prozesse wird hauptsächlich über die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren vermittelt.

1.4.3 Transkriptionsfaktoren

Für die intrazelluläre Signalübertragung und die Regulierung der Produktion zahlreicher Proteine stellen Transkriptionsfaktoren eine zentrale Rolle dar. Diese werden durch

äußere Stimuli über membranständige Rezeptoren aktiviert mit nachgeschalteter Translokation des Transkriptionsfaktors aus dem Cytoplasma in den Zellkern. Hier binden sie an der Promotorregion von Genen und beeinflussen die Transkription der entsprechenden mRNA (siehe Abb. 3).

Stimulus (IFN)

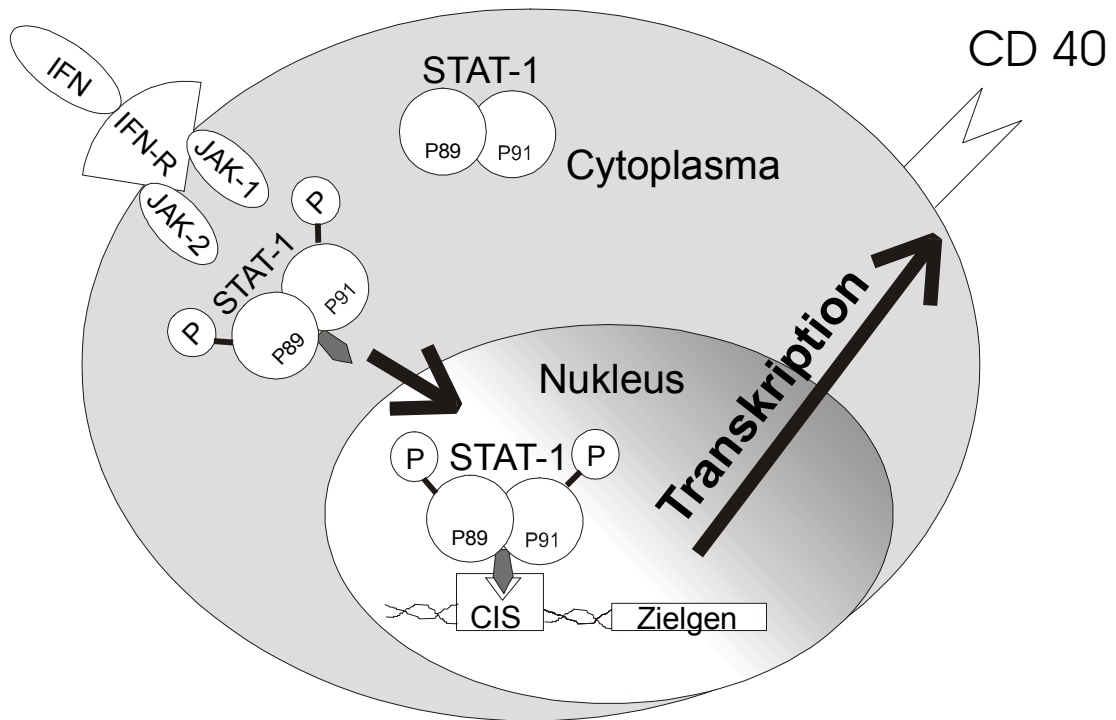


Abb. 3: Schematische Wirkungsweise eines Transkriptionsfaktors am Beispiel von STAT-1 und dem Zielgen CD40: Durch einen externen Stimulus (z.B.: IFN γ) kommt es Rezeptor vermittelt (IFN-R) zur Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors durch Januskinasen (JAK). Diese aktive Form des Transkriptionsfaktors transloziert in den Nukleus, wo sie an der Promotorregion (cis) bindet, um die Transkription der Zielgene zu initiieren (hier als Beispiel das Zielgen und die Transkription von CD 40).

1.4.4 Die Transkriptionsfaktoren STAT-1 und AP-1

Die beiden Transkriptionsfaktoren AP-1 und STAT-1 spielen eine Schlüsselrolle im Rahmen der T-Zell Aktivierung [30] [31]. Die Inhibition der Transkriptionsfaktoren STAT-1 und AP-1 als therapeutische Option wurde in mehreren Studien untersucht [32] [33] [34].

1.4.4.1 Signal transducer and activator of transcription-1

Die STAT-Familie umfasst eine Gruppe von mehreren Transkriptionsfaktoren (STAT 1-6). Diese Proteine, die als Homo- oder Heterodimere auftreten können, sind an

der Integration und Verarbeitung von cytokin-vermittelten Signalen beteiligt. Die sehr gut erforschte Signaltransduktion läuft nach folgendem Schema ab: An den Typ-I und Typ-II Domänen der Cytokinrezeptoren im Cytoplasma sind spezielle Enzyme, die sog. Januskinasen, angelagert. Bindet nun ein Cytokin und führt so zu einer Vereinigung der beiden Anteile des Rezeptors, werden die Januskinasen durch eine Transphosphorylation aktiviert und sorgen ihrerseits für eine Phosphorylierung der cytoplasmatischen Rezeptoranteile. Diese aktivierten Rezeptor-Verbindungen können von STAT-Proteinen erkannt werden, die sich im Cytosol befinden. Auf diese Weise werden zwei gleiche oder meist verschiedene STAT-Proteine an den Januskinasen angelagert und von den Enzymen phosphoryliert. Die beiden STAT-Proteine dimerisieren nach der Aktivierung und dissoziieren als Verbund wieder vom Rezeptorkomplex. Das Dimer kann nun in den Kern wandern und dort an der Promotorregion der DNA binden und so die Transkription von Genen beeinflussen. Die STAT Proteine reagieren größtenteils spezifisch auf die Stimulation eines bestimmten Cytokins. So spielt STAT-1 eine zentrale Rolle in der über IFN- γ vermittelten Immunantwort [35] [36]. Die IFN- γ -induzierte Expression des zentralen Adhäsionsmoleküls ICAM-1 wird intrazellulär von dem Transkriptionsfaktor STAT-1 reguliert [37]. IFN- γ induziert auch die Expression der für die Immunantwort wichtigen MHC-II-Komplexe auf den Endothelzellen. Dies ist auf transkriptioneller Ebene STAT-1 getriggert [38]. Darüber hinaus wird der apoptotische Zelltod nach Ischämie- und Reperfusionsschaden mit der Signaltransduktion von STAT-1 in Verbindung gebracht [39] [40] [41]. STAT-1 spielt auch eine wichtige Rolle für die endotheliale CD40-Expression. So ist die cytokin-induzierte Hochregulation dieses Moleküls STAT-1 vermittelt [34].

1.4.4.2 Activation protein-1

Die Familie des Transkriptionsfaktors AP-1 kann in drei Untergruppen unterteilt werden:

1. Die Jun-Familie (v-Jun, c-Jun, JunB, JunD),
2. Die Fos-Proteine (v-Fos, c-Fos, FosB, Fra1, Fra2)
3. Die Gruppe der Aktivierungsfaktoren (ATF-2, ATF-3, B-ATF)

Diese Untergruppen können verschiedene Formen von Homo- und Heterodimeren bilden [42]. AP-1 ist ein Transkriptionsfaktor, der in vielen Zellen vorkommt, aber speziell in aktivierten T-Zellen zu finden ist. So kommt es T-Zell-Rezeptor vermittelt

zur Anhäufung von AP-1 im Nukleus von T-Zellen. Auch in der Frühphase der akuten Abstoßung kann die Induktion des Transkriptionsfaktors AP-1 nachgewiesen werden. Während der Ischämie- und Reperfusionsphase wird dieser intrazelluläre Botenstoff aktiviert [43] und ist in besonders konzentrierter Form in den Endothelzellen der Gefäße zu finden [44]. Dies wird mit dem Auftreten von reaktiven Sauerstoffradikalen in Verbindung gebracht [45]. Außerdem kommt es nur durch das Zusammenspiel von AP-1 und einem weiteren Transkriptionsfaktor, NFAT, zu der Produktion von IL-2, eines der zentralen Cytokine der Transplantatabstoßung [46]. Aber auch eine Reihe weiterer Interleukine (z.B. IL-4) und der für die Apoptose relevante Ligand FasL werden hinsichtlich ihrer Expression in T-Zellen von dem Zusammenspiel der beiden Transkriptionsfaktoren kontrolliert. Weiterhin konnte in *In-vitro* Versuchen gezeigt werden, dass die basale Expression des CD40-Moleküls in Endothelzellen von der AP-1-Aktivität abhängig ist [34]. Die zentrale Rolle dieses Transkriptionsfaktors für die Aktivierung und Proliferation von T-Lymphozyten zeigt sich insbesondere dadurch, dass die Inhibition von AP-1 einen molekularen Mechanismus für die klonale Anergie darstellt [47]. So werden eine Reihe weiterer Zell-zu-Zell-Interaktionen erst über die Aktivierung dieser intrazellulären Botenstoffe in Gang gesetzt.

1.5 Adhäsionsmoleküle

Zu den klassischen Vermittlern von Zell-zu-Zell-Interaktionen zählen die Adhäsionsmoleküle, da sie den dichten Kontakt einer Zelle zu einer zweiten bewirken. Als Adhäsionsmoleküle werden Proteine bezeichnet, die auf der Zelloberfläche von Zellen wie z.B. Endothelzellen exprimiert werden. Damit können diese Moleküle unter anderem Leukozyten das Eindringen in das Zielgewebe ermöglichen. Man unterteilt sie in unterschiedliche Familien. Als wichtigste seien hier nur die Selektine und Vertreter der Immunglobulin-Superfamilie (Ig-Superfamilie = Integrine) erwähnt. Bei beiden handelt es sich um transmembrane Glykoproteine, die im Zusammenspiel die Adhäsion und Migration von Zellen ermöglichen. Bezüglich der Diapedese phagozytierender Blutzellen vermitteln Selektine in erster Linie eine schwache, reversible Bindung der Leukozyten an der Gefäßwand [48]. Die wichtigsten Vertreter von endothelialer Seite sind P-Selektin, welches bereits vorgebildet in sog. „Weibel bodies“ gespeichert wird [48] und somit innerhalb von Sekunden an die Zelloberfläche gebracht werden kann und das E-Selektin, welches ausschließlich von Endothelzellen nach Induktion durch Cytokine gebildet wird [48] [49, 50].

Die Mitglieder der Ig-Superfamilie, zu deren wichtigsten Vertretern das intrazelluläre Adhäsionsmolekül-1 (ICAM-1) und das vaskuläre Adhäsionsmolekül-1 (VCAM-1) gehören, vermitteln nun die feste Adhäsion und die transendotheliale Migration der Leukozyten [48] [51]. Diese Moleküle werden während unterschiedlicher inflammatorischer Prozesse nach Aktivierung exprimiert und gelten als zentrale Vermittler der Bindung zwischen Leukozyten und Endothelzellen [52].

Damit nun Abwehrzellen wie Leukozyten und Monozyten ein Endothel durchdringen können (=Diapedese), bedarf es des Zusammenspiels mehrerer Adhäsionsmoleküle. In dieser Kaskade werden verschiedene Stadien unterschieden (siehe Abb. 4). Nach einer initialen Aktivierung des Endothels durch inflammatorische Cytokine wie z.B. $\text{TNF-}\alpha$ wird die Bildung von Selektinen induziert. Die schwache Bindung der Selektine wird ohne die Adhäsion durch weitere Moleküle durch den Blutfluss immer wieder gelöst und es kommt so zu dem Entlangrollen der Leukozyten, dem sog. „Rolling“, welches zur Verlangsamung der Zellen führt und damit als erster Schritt zur Adhäsion gilt. Danach vermitteln endotheliale Oberflächenrezeptoren (z.B. ICAM-1 und VCAM-1) und ihre Gegenspieler auf den immunkompetenten Zellen (z.B. LFA-1 und VLA-4) erst die irreversible Bindung, welches als „Sticking“ bezeichnet wird. Nun können sich die anhaftenden Blutzellen ausbreiten („Spreading“) und letztendlich die Gefäßwand transmigrieren (siehe Abb. 4).

Soweit bekannt, findet diese Rekrutierung der Leukozyten während der Transplantatabstoßung nach gleichem Muster statt [53]. Man konnte sowohl in Tiermodellen als auch bei Biopaten aus humanen Transplantaten im Rahmen der akuten Abstoßung die Expression von Adhäsionsmolekülen feststellen. Durch die gezielte Blockade dieser Oberflächenmoleküle konnte sowohl das Transplantatüberleben verlängert als auch die Ausbildung der Transplantat-vasculopathie vermindert werden [54] [55], indem die Infiltration der Transplantate inhibiert wurde.

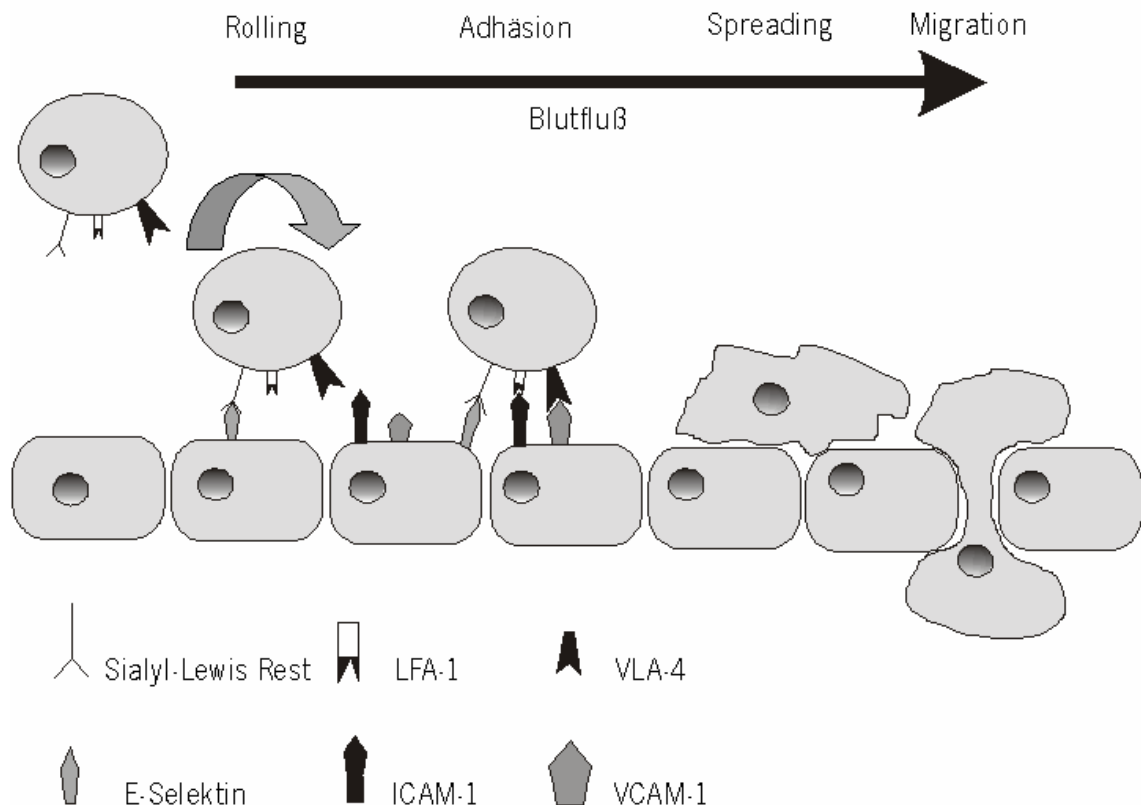


Abb. 4: Zusammenspiel der Adhäsionsmoleküle im Rahmen der Diapedese: Zuerst kommt es durch Mitglieder der Selektin Familie (hier z.B. E-Selektin auf dem Endothel und Sialyl-Lewis-Rest auf dem Leukozyten) zu einer lockeren Bindung und dem Entlangrollen der Leukozyten an der Gefäßwand („Rolling“). Erst durch Vertreter der Ig-Superfamilie(=Integrine)(Beispiel ICAM-1 und VCAM-1 endothelial und LFA-1 und VLA-4 auf zellulärer Seite) wird die Adhäsion so gefestigt, dass sich die Leukozyten an der Gefäßwand anheften („Adhäsion“), sich ausbreiten („Spreading“) und schließlich das Endothel durchdringen können („Migration“).

1.6 Cytokine und Chemokine

Während der Infiltration des Transplantates durch immunkompetente Zellen kommt es zur Produktion von Cytokinen wie z.B. Interferon (IFN)- γ oder Interleukin-2 (IL-2) [56] [57]. Diese Polypeptide werden in Folge eines Antigenreizes von immunkompetenten Zellen freigesetzt. Dadurch werden Effektormechanismen der akuten Abstoßung induziert.

Das von aktivierten T-Zellen produzierte IL-2 ist ein Wachstumsfaktor für antigen-stimulierte T-Zellen und verantwortlich für die klonale Expansion und die Proliferation

von T-Zellen. Die zentrale Rolle zeigt sich dadurch, dass es durch eine Inhibition von IL-2 zur Toleranzinduktion kommen kann [58] und die Beeinflussung der Expression des IL-2-Rezeptors in Tierexperimenten die akute Abstoßung unterdrückte [59] [60]. Darüber hinaus werden Antikörper gegen den Rezeptor dieses zentralen Interleukins im Rahmen der Infusionstherapie sowie bei der akuten Transplantatabstoßung therapeutisch eingesetzt [61].

IFN- γ wird von aktivierten T-Lymphozyten und natürlichen Killerzellen produziert. Die Hauptfunktion von IFN- γ ist die Aktivierung von Makrophagen, sowohl während der angeborenen als auch bei der adaptierten zellvermittelten Immunantwort. Zusätzlich spielt IFN- γ eine Rolle bei der T-Zell-Differenzierung. Darüber hinaus kann die Expression des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 durch INF- γ induziert werden [37]. INF- γ vermittelt zusätzlich die Expression der für die Immunantwort wichtigen MHC-II-Komplexe auf den Endothelzellen [38].

Eine spezielle Gruppe der Cytokine mit einer weitreichenden Homologie sind die Chemokine. Dieser Name leitet sich von der Tatsache ab, dass sie hauptsächlich chemotaktische Wirkung besitzen. Chemokine werden von einer weitreichenden Zahl verschiedener Zellen wie stimulierten Makrophagen, T-Zellen oder cytokinaktivierten Endothelzellen produziert.

Ein wichtiger Vertreter dieser Familie ist das „Monocyte chemoattractant protein“ (MCP)- 1 [62]. Dieses Chemokin spielt eine wichtige Rolle in der unspezifischen Immunantwort. So vermittelt MCP-1 die Rekrutierung von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen und Monozyten aus den Gefäßen in das extravasale Gewebe. Damit spielt dieses Chemokin eine zentrale Rolle bei der Vermittlung der Infiltration des Transplantates und bei der Induktion der zellvermittelten Effektormechanismen, die zur Zerstörung des Organs führen können.

1.7 Effektormechanismen der akuten Transplantatabstoßung

Unterschiedliche Effektormechanismen vermitteln die Transplantatabstoßung. Dabei spielen verschiedene Zellen eine Rolle [63] [12]. Eine Form der Transplantatzerstörung wird durch die direkte Zytotoxizität von natürlichen Killerzellen verursacht. Diese Zellen sezernieren Substanzen, die die Zellmembran der Zielzellen lysieren und damit deren Untergang induzieren. Aber auch CD8⁺ T-Zellen können zur direkten Zerstörung des Transplantatgewebes führen, indem sie auf der einen Seite über die Freisetzung von Granenzym B und Perforin [64] durch Erhöhung der Membranpermeabilität zur

osmotischen Zerstörung der Zellen führen [65] oder über den Fas/Fas-Ligand-Mechanismus [66] zur Induktion der Apoptose, dem programmierten Zelltod, beitragen. Bei der Apoptose von Zellen kommt es nach der Stimulation von Zellrezeptoren über intrazelluläre Signalkaskaden zur Defragmentierung der DNA durch Endonukleasen und zum Schrumpfen des Zellkernes. Damit wird im Gegensatz zur Nekrose die Zelle durch eigene intrazelluläre Mechanismen gesteuert zerstört (zur Übersicht: [67] [68] [69]). Dieser geregelte Zellabbau spielt eine große Rolle bei vielen physiologischen Umbauprozessen des Körpers. Darüber hinaus konnte bei vielen pathologischen Prozessen und im Zeitverlauf sowohl der akuten als auch der chronischen Abstoßung ebenfalls eine Erhöhung der Apoptoserate und damit eine Störung des Gleichgewichts von Zellab- und aufbau festgestellt werden [70] [71] [72].

Auch nicht direkt durch Alloantigene aktivierte, sondern unspezifisch stimulierte Zellen, wie z.B. durch Chemokine (z.B. MCP-1) angelockte Monozyten und eosinophile Leukozyten, können das Transplantat schädigen. Makrophagen können toxische Moleküle freisetzen, wie z.B. Stickstoffmonoxid (NO), eine hoch reaktive Substanz, die über die Dilatation von Gefäßen zu Ödemen führt und in hohen Konzentrationen direkt zytotoxisch wirkt. Die Rolle von NO wird allerdings sehr kontrovers diskutiert, da es als Vasodilatator an vielen physiologischen Prozessen beteiligt ist und somit auch einen positiven Einfluss auf pathologische Geschehen hat wie z.B. während der Ischämie- und Reperfusionsphase des Transplantates [73] [74]. Das von der hauptsächlich in Makrophagen exprimierten, induzierbaren Form der NO-Synthetase (iNOS) produzierte NO tritt bei vielen inflammatorischen Prozessen auf und wird im Zusammenhang mit der akuten Abstoßung zusätzlich mit der Induktion der Apoptose und damit der Schädigung des Transplantates in Verbindung gebracht [70] [75] [71].

1.8 Die Erforschung der Transplantatabstoßung durch den Einsatz von Tiermodellen

Um nun dieses multifaktorielle Geschehen der akuten Transplantatabstoßung zu erforschen, stellen Tiermodelle eine Möglichkeit dar, Grunderkenntnisse aus der Forschung mit Zellkulturen in einem komplexen, immunologischen Umfeld zu testen. Es gibt verschiedene Tiermodelle: z.B. Maus-, Ratten- und Schweine-Transplantationsmodelle. Die etablierten Transplantationsmodelle bei Ratten bieten dabei mehrere Vorteile: Bei Ratten handelt es sich um Tiere, die in genetisch genau definierten

Inzuchtlinien verfügbar sind. Zusätzlich bietet die Größe der Tiere im Vergleich zu Mäusen den Vorteil, dass die Operation technisch einfacher und so mit einer höheren Erfolgsquote zu rechnen ist. Die Tiere sind darüber hinaus im Vergleich zu Schweinen relativ einfach artgerecht zu halten.

Bei dem hier gewählten Modell handelt es sich um ein heterotopes Transplantationsmodell (Erstbeschreibung von Ono et al. 1969 [76]), d.h., das Spenderherz wird in das Abdomen des Empfängers transplantiert. Diese etablierte Technik gibt es in mehreren Operationsvarianten. So gibt es die Technik, dass das Transplantat mittels eines Verbindungsstückes (sog. Cuff) im Austausch mit einer Niere in das Abdomen eingebracht wird. Bei der hier benutzten Methode wird das Herz ohne Hilfsmittel durch zwei End-zu-Seit Anastomosen caudal der Gefäßabgänge der Nieren an die großen Bauchgefäße angeschlossen.

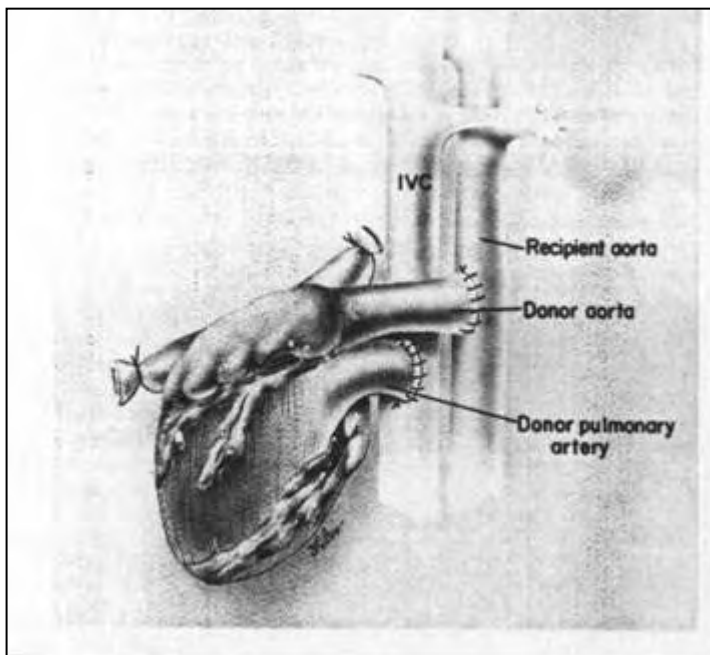


Abb. 5: Das heterotop transplantierte Herz: Die Stümpfe der großen Gefäße des Transplantates (Aorta = „Donor aorta“ und Truncus Pulmonalis=Donor pulmonary artery) werden an die großen Bauchgefäße des Empfängers angeschlossen (aorta abdominalis=„Recipient aorta“ und vena cava caudalis =„IVC“) (aus: *Handbook of Animal Models in Transplantation Research*, Donald V Cramer et al.1994)

Damit erhält man ein „non working heart“ Modell, d.h., dass das Transplantat nicht gegen den physiologischen Druck schlägt. Dies spielt für die immunologischen Untersuchungen nur eine untergeordnete Rolle.

Trotzdem sollte erwähnt werden, dass es auch Bemühungen gibt, die Abweichung des Modells von den physiologischen Bedingungen durch chirurgische Modifikationen zu beheben [77].

1.9 Therapeutische Ansätze zur Modulation der akuten Abstoßung

Das Organ vor Schäden durch das Immunsystem des Empfängers zu schützen und gleichzeitig die Immunabwehr in Bezug auf andere antigene Reize möglichst unbeeinflusst zu lassen und so die Gefahr der erhöhten Infektionsrate bei dem Patienten zu minimieren, das ist die Aufgabe der immunsuppressiven Therapie für den Transplantatempfänger. Ein Hauptziel für die therapeutischen Ansätze sind die T-Zellen des Empfängers, da sie im Mittelpunkt der Immunantwort stehen. Durch die Entdeckung des Immunsuppressivums Cyclosporin A (CsA), welches erstmals 1978 bei einer Nierentransplantation klinisch eingesetzt wurde [78] [79], war es möglich, die Vorgänge der akuten Transplantatabstoßung sehr effektiv zu unterdrücken. CsA, ein Calcineurin Inhibitor, verhindert in erster Linie die Produktion des Cytokins Interleukin (IL)-2, welches, wie schon erwähnt, eine zentrale Rolle in der T-Zell-Aktivierung und -Proliferation spielt [80] [81]. Dies wird über die direkte Beeinflussung der intrazellulären Signaltransduktion bewirkt. CsA inhibiert einen Transkriptionsfaktor, den „nukleären Faktor von aktivierten Zellen“ (NFAT), der die Transkription einer Reihe von Proteinen und Cytokinen reguliert. Im Vergleich zu den bisher eingesetzten Immunsuppressiva, wie z.B. Azathioprin [82] und den antiinflammatorischen Steroiden, wirkt CsA direkt auf T-Lymphozyten. Die Infektionsrate bei den Empfängern konnte so trotz ausreichender Immunsuppression stark gesenkt werden. Die Immunsuppression, basierend auf der Calcineurin Inhibition, stellt auch heute noch mit einem Anteil von über 80% einen der Eckpfeiler der post-operativen Therapie dar [4].

Trotzdem kommt es innerhalb der ersten Tage und Wochen auch unter der auf Calcineurin Inhibition basierenden immunsuppressiven Therapie mit einer Frequenz von 1,3 Episoden zur akuten Abstoßung im ersten Jahr *post transplantationem* [83] [84] [85], wobei es auch später noch zu akuten Abstoßungsperioden kommen kann. Sowohl laut Single-Center- [86] [87] als auch nach Multi-Center-Studien [88], Ende der 90iger Jahre, kommt es bei Patienten, die eine CsA-basierte immunsuppressive Therapie erhalten, mit einer fast 100%igen Inzidenz zu akuten Abstoßungsperioden.

Um diese Immunsuppression nun zu verbessern, wurden sowohl in Tierversuchsmodellen als auch in Studien an Patienten eine Reihe von unterstützenden Maßnahmen getestet. Über die Blockade der Kostimulation konnte in Studien Toleranz induziert und das Überleben von Transplantaten verlängert werden [22]. Nicht nur die direkte

Kostimulation der T-Zellen (*cis*-Kostimulation), sondern auch die sog. *trans*-Kostimulation z.B. durch Endothelzellen spielt eine wichtige Rolle im Rahmen der Aktivierung der transmigrierenden, das Transplantat infiltrierenden Zellen.

Das Endothel des Transplantates bildet die erste Zellbarriere, die von Seiten des transplantierten Fremdgewebes in Kontakt zu dem Empfängerblut tritt. Damit steht und stand das Transplantatendothel immer wieder im Zentrum von Untersuchungen [89]. Nicht nur die Auswirkung auf die das Endothel durchwandernden Zellen, sondern gerade auch die Mechanismen, die dieses Eindringen der Abwehrzellen überhaupt ermöglichen, stellen ein viel versprechendes Ziel für die Transplantatprotektion dar. So konnten direkte Antikörper gegen die auf den Endothelzellen exprimierten Adhäsionsmoleküle sowohl in akuten wie auch in chronischen Abstoßungsmodellen das Transplantatüberleben verlängern [90] [91] [92] [93].

Trotz dieser Versuche, die Abstoßungskaskade direkt nach erfolgter Transplantation zu stoppen, stellen sowohl akute Abstoßungsperioden als auch die chronische Transplantatdysfunktion präsent Probleme in der aktuellen Transplantationsmedizin dar. Daher gilt es, die Suche nach neuen Strategien zur Verhinderung der Transplantatabstoßung und damit verbunden ein tiefer greifendes Verständnis der Pathomechanismen weiter fortzuführen.

Im Zentrum der hier beschriebenen Studie stand die Frage, inwieweit durch zwei unterschiedliche Strategien das Transplantat so früh wie möglich vor jeglichem Schaden geschützt und somit die Pathomechanismen der akuten Abstoßung positiv beeinflusst werden kann.

1.9.1 3-Deazaadenosin (c3Ado)

Ist das Immunsystem aktiviert, kommt es zur Synthese zahlreicher Botenstoffe, die die Abstoßungskaskade in Gang setzten. Damit diese Vorgänge überhaupt ablaufen können, spielt die Energieübertragung eine zentrale Rolle. Diese wird meist durch die Übertragung von aktiven Phosphatverbindungen in Phosphorylierungsreaktionen bewirkt. Daneben kommt es bei der Biosynthese gehäuft zur Übertragung von Methylgruppen. Diese stammen meistens als sog. „aktive Methylgruppen“ aus dem Methylierungszyklus, in dem das Methionin die zentrale Rolle spielt. Die Methylgruppen werden zum einen, wie bereits erwähnt, zur Biosynthese benötigt; zusätzlich wird durch die Methylierung der Phospholipide in den Zellmembranen deren Durchlässigkeit erhöht. Auch im Verlauf des Zellwachstums und der Zelldifferenzierung kommt es zu Methylierungsreaktionen. Durch die Bindung einer

Methylgruppe an den Enden von mRNA Strängen werden diese zum einen vor ihrem Abbau geschützt und zum andern die Translationsrate erhöht [94].

C3Ado ist als Adenosin-Analogon in erster Linie bekannt als Methylierungsinhibitor.

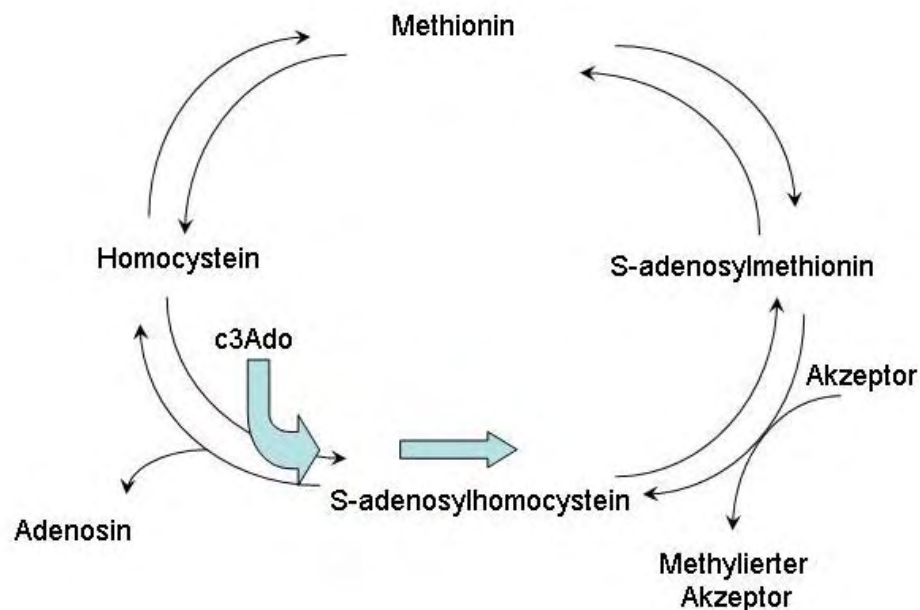


Abb. 6: Die Wirkung von c3Ado auf den Methylierungszyklus: Wenn c3Ado als Adenosin-Analogon als Substrat im Überschuß zur Verfügung steht, kommt es zur Verschiebung des Reaktionsgleichgewichts im Methylierungszyklus. Dadurch wird die Hydrolyse von S-adenosylhomocystein verhindert und durch dessen Anreicherung kommt es zur Umkehr der Methylierungsreaktion. Damit wird die Abgabe der Methylgruppen gehemmt.

Wie bei zahlreichen chemischen Reaktionen kann auch die Umsetzung von S-adenosylhomocystein zu Homocystein + Adenosin in die entgegengesetzte Richtung stattfinden und es kommt zu einem Reaktionsgleichgewicht. Daher kann c3Ado, indem es als Adenosin-Analogon als Substrat für S-Adenosylhomocystein im Überfluß zur Verfügung steht, das Gleichgewicht verschieben und damit den Methylierungszyklus blockieren und die Abgabe der Methylgruppen verhindern.

Neben der Inhibition von Methylierungsreaktionen zeigte c3Ado in *In-vitro*-Versuchen antiinflammatorische und immunmodulatorische Fähigkeiten. So konnte durch c3Ado die TNF- α -induzierte Expression von Adhäsionsmolekülen inhibiert werden [95]. Zusätzlich schwächte c3Ado das chemotaktische Potenzial von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten und die Phagozytose-Fähigkeit von Monozyten/Makro-

phagen [96]. Darüber hinaus inhibierte in anderen *In-vitro* Studien c3Ado die durch LPS induzierte Liberation von TNF- α und IL- β von Leukozyten [97] und verhinderte die Produktion von Arachidonsäure und reaktiven Sauerstoffradikalen [98] [99].

Die hohe *In-vivo* Effektivität dieser Substanz zeigte sich in einem Atherosklerose-Modell. Die orale Gabe von c3Ado bei Mäusen inhibierte die Expression von Adhäsionsmolekülen. Dadurch verminderte sich die Infiltration mononukleärer Zellen und die Bildung von atherosklerotischen Plaques [100]. Weiterhin wurde in einem Ratten-Modell die durch LPS induzierte septische Kardiomyopathie durch die intraperitoneale Gabe von c3Ado die myokardiale Dysfunktion verringert. Dies konnte durch eine reduzierte Expression von Adhäsionsmolekülen, minimierte NF- κ B-Aktivierung und Produktion von iNOS und ROS sowie Inhibition der TNF- α Freisetzung erreicht werden [101]. Eine andere Arbeitsgruppe zeigte, dass durch den Einsatz von c3Ado der Ischämie- und Reperfusionsschaden in einem isolierten Lungenmodell verringert werden kann [102]. Sowohl in den *In-vitro* Studien, als auch in den *In-vivo* Studien zeigte c3Ado immer wieder die Fähigkeit, die Expression von Adhäsionsmolekülen zu inhibieren. Diese spezifische Wirkung von c3Ado auf die Endothelzellen könnte zur Verhinderung des initialen Organschadens nach Transplantation von großem Interesse sein.

1.9.2 Inhibition der Transkriptionsfaktoren STAT-1 und AP-1

Im Zentrum der Untersuchungen stand die Frage, ob man durch die Inhibition der Transkriptionsfaktoren STAT-1 und AP-1 die initialen Vorgänge der Abstoßungskaskade beeinflussen und somit die Fröhschäden durch die Transplantatabstoßung minimieren kann. Dafür griffen wir gezielt in die intrazellulären Prozesse der Zellen ein.

Zur Inhibition der beiden Transkriptionsfaktoren wurde die Decoy Technologie verwandt. Hierbei werden Oligodesoxynukleotide (ODN), die in ihrer Sequenz der Bindungsstelle des jeweiligen Transkriptionsfaktors an die DNA des Kerns entsprechen, als „Köder“ (engl.: Decoy = Köder) für die Transkriptionsfaktoren eingesetzt. Dadurch werden die Transkriptionsfaktoren intrazellulär abgefangen und können nicht mehr an der DNA binden. Somit kann die Regulation der Zielgene des Transkriptionsfaktors spezifisch inhibiert werden; zur Übersicht: [103] [104] [105]. Daher steht die Methode im Zentrum der Suche nach neuen therapeutischen Strategien [104] [105]. So konnte mit dieser Methode die durch Ballondilatation initiierte Bildung einer Neointima durch die Inhibition des Transkriptionsfaktors NF- κ B vermindert werden [106]. Weiterhin

konnten durch die Decoy-vermittelte Inhibition von NF- κ B die Folgen von Ischämie-Reperfusionsschäden, die akute Abstoßung und die Ausprägung der Transplantat-vasculopathie minimiert werden [107].

Mittels der für diese Studie bereitgestellten Decoys sollten nun die Bindungsstellen von zwei verschiedenen Transskriptionsfaktoren blockiert werden, „signal transducer and activator of transcription-1“ (STAT-1) und „activation protein-1“ (AP-1).

1.10 Ziel der Studie

Das Ziel der Studie war es, neue therapeutische Strategien zu untersuchen, um in einem vollständig allogenen und damit der klinischen Situation entsprechenden Herztransplantationsmodell den initialen Organschaden zu minimieren und damit die Pathomechanismen der akuten Transplantatabstoßung zu beeinflussen. Daraus resultierten folgende zentrale Fragen der Studie:

- I – Immunmodulation mit c3Ado

- A) Beeinflusst der Einsatz der immunmodulatorischen Substanz c3Ado das Transplantatüberleben?
- B) Führt der Einsatz von c3Ado histologisch und molekularbiologisch zur verminderten Expression von Adhäsionsmolekülen?
- C) Kommt es durch den Einsatz von c3Ado zu einer Veränderung der zellulären Infiltration der Transplantate?
- D) Kommt es molekularbiologisch unter der c3Ado-Therapie in Bezug auf IL-2 und MCP-1 zu Veränderungen im Transplantatgewebe?

- II – der Einsatz von STAT-1 und AP-1 Decoys

- A) Wie wirkt sich der Einsatz von AP-1- und STAT-1-Decoys auf das Transplantatüberleben aus?
- B) Ist der Einfluss spezifisch auf die Sequenz der Decoys zurückzuführen und wo reichern sich die Decoys im Transplantatgewebe an?
- C) Führt der Eingriff in die intrazelluläre Signaltransduktion durch die AP-1- und STAT-1-Decoys histologisch und molekularbiologisch zur verminderten Expression von Adhäsionsmolekülen?
- D) Welchen Einfluss auf die Infiltration der Transplantate hat der Eingriff in die intrazelluläre Signaltransduktion durch die AP-1- und STAT-1-Decoys?

2 MATERIAL UND METHODEN

Materialliste

Geräte (alphabetisch):

Bio-Imaging Analyzer	Biometra	Göttingen	D
Fluoreszenzmikroskop	Leica	Wetzlar	D
Kryostat	Leica	Wetzlar	D
Thermozykler	Promega	Mannheim	D
UV-Luminometer	Biometra	Göttingen	D

Verbrauchsmaterial (alphabetisch):

Eppendorf Tube®	Eppendorf	Hamburg	D
Fertignahrung	Altramin, Labortierservice	Lage-Lippe	D
Falcon-Röhrchen	Becton Dickinson	Franklin Lakes	USA
	Labware		
Korkplättchen	Roth	Karlsruhe	D
Perma-Handseide®	Ethicon	Brüssel	BEL
Prolene®	Ethicon	Brüssel	BEL
Safe-Lock-Tubes®	Eppendorf	Hamburg	D
Tissue-Tek® O.C.T	Sakura Fine Technical		
Vicryl®	Ethicon	Brüssel	BEL

Chemikalien (in der Reihenfolge der Erwähnung im Text):

Isofluran Forene®	Abbott	Wiesbaden	D
Ketamin Ketanest®	Insera	Freiburg	D
Xylazinhydrochlorid Rompun®	Bayer	Leverkusen	D
Isotone NaCl-Lösung	Roth	Karlsruhe	D
c3Ado	Southern Research	Birmingham	USA
Isopenthan	Roth	Karlsruhe	D
Aceton	Merck	Darmstadt	D
Hämatoxylin Hämalan®	Merck	Darmstadt	D
Eosin	Merck	Darmstadt	D
Resorchin-Fuchsin	Chroma	Köngen	D
Mouse polyclonal-anti-rat ICAM-1 IgG	Seikagaku	Tokyo	Jap.
Goat monoclonal-anti-human VCAM-1 IgG	Santa Cruz	Santa Cruz	USA
Mouse monoclonal-anti-rat MHC II IgG	Serotec	Oxford	GB
Mouse monoclonal-anti-rat ED 1 IgG	Serotec	Oxford	GB
Mouse monoclonal anti-rat R73, TCR alpha/beta IgG	Serotec	Oxford	GB
Rabbit polyclonal-anti rat iNOS IgG	Santa Cruz	Santa Cruz	USA
Tris-Base	Sigma	Deisenhofen	D

Tris-HCL	USB	Cleveland Ohio	USA
NaCl	Roth	Karlsruhe	D
rabbit polyclonal anti-mouse-IgG	DAKO	Hamburg	D
Mouse monoclonal anti-goat IgG	DAKO	Hamburg	D
Mouse monoclonal anti-rabbit IgG	DAKO	Hamburg	D
APAAP-Komplex	DAKO	Hamburg	D
Rattenserum	Sigma	Deisenhofen	D
Neufuchsinhaltige Lösung	Merck	Darmstadt	D
Roti- Quick- Kit	Roth	Karlsruhe	D
Ethanol	Roth	Karlsruhe	D
Destilliertes Wasser	Baxter	Unterschleißheim	D
Random Primer	Eppendorf	Hamburg	D
Puffer 5x	Eppendorf	Hamburg	D
dNTP's (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 10mM)	Eppendorf	Hamburg	D
0,1 M DTT	Eppendorf	Hamburg	D
Rnasin	Eppendorf	Hamburg	D
RT	Eppendorf	Hamburg	D
10x Taq	Eppendorf	Hamburg	D
Taq	Eppendorf	Hamburg	D
Primer:			
IL-2	Freundliche Gabe von Dr. Randolph, Universität Marburg		
MCP-1	[108]		
ICAM-1	[109]		
VCAM-1	[109]		
PBGD	[110]		
Gel loading solution	Sigma	Deisenhofen	D
Agarose Gel	Sigma	Deisenhofen	D
Ethidiumbromid 1%	Roth	Karlsruhe	D
DNA/ Hinf I –Markers	Promega	Mannheim	D
DNA laddering kit	R&D Systems	Wiesbaden	D
in situ cell death detection kit	Roche	Mannheim	D
Paraformaldehyd	Roth	Karlsruhe	D
Triton X®	Boehringer	Mannheim	D
0,1% Natriumcitrat	Sigma	Deisenhofen	D
LPS	Sigma	Deisenhofen	D

Verwendete Puffer

(Stammlösung/Verdünnungen mit aqua Dest):

TRIS Puffer	<ul style="list-style-type: none">- 1,8g Tris Base- 13,7g Tris HCL- 17,5g NaCL- ad 2l aqua dest- pH 7.4-7.6
10xPBS:	<ul style="list-style-type: none">- 85g NaCL- 10,7g Na₂HPO₄- 3,9g NaH₂PO₄ x 2H₂O- ad 1l aqua dest- pH 7.2
50xTAE	<ul style="list-style-type: none">- 242g Tris Base- 57,1ml Eisessig- 100ml 0,5M EDTA- pH 8.0- ad 1l aqua dest

2.1 Tierexperimenteller Teil

2.1.1 Versuchstiere

2.1.1.1 Herkunft der Tiere

Die in der Studie verwendeten Tiere wurden vom Tierzuchtlabor Harlan Winkelmann (Borchen, Deutschland) bezogen. Alle Tiere waren laut Gesundheitszeugnis in Bezug auf die für Labortiere standardisiert untersuchten Infektionskrankheiten gesund.

Männliche Lewis (LEW, RT11) Inzuchtratten dienten als Empfängertiere für Spenderherzen von männlichen Wistar-Furth (WF, RT1u) Inzuchtratten. Die Transplantation wurde durchgeführt, sobald die Tiere ein durchschnittliches Gewicht von ca. 200g bei den Spendertieren (WF) und ca. 300g bei den Empfängertieren (LEW) erreicht hatten.

2.1.1.2 Tierversuchsgenehmigung

Für die Tierversuche lagen „Genehmigungen zur Durchführung von Versuchen an

Wirbeltieren“ unter den Aktenzeichen AZ 24/2002 und AZ 38/2002 vor.

2.1.1.3 Tierhaltung

Während der Versuchsdauer wurden die Ratten bis zum ersten Tag postoperativ einzeln, danach zu zweit in Käfigboxen in einem klimatisierten Tierstall (22°C bei mittlerer Feuchte) mit konstantem Tag-Nacht-Rhythmus (12-Stunden-Rhythmus bei Beleuchtung mit Leuchtstoffröhren) gehalten. In diesem Zeitraum, auch unmittelbar prä- und postoperativ, erfolgte die Ernährung mit Wasser aus Trinkflaschen und pelletierter Fertignahrung, die jedem Tier jederzeit frei zugänglich war.

Die Pflege und Betreuung der Tiere (tägliche Erneuerung der Tränke und der Einstreu) wurde von einer ausgebildeten Tierpflegerin durchgeführt.

2.1.2 Herztransplantation

2.1.2.1 Narkose

Alle Eingriffe wurden an narkotisierten Tieren durchgeführt. Die Kurzzeithnarkosen wurden mit dem Inhalationsnarkotikum Isofluran vorgenommen, indem mit Isofluran getränkte Tupfer in einer Atemmaske eingesetzt wurden. Bei dem Narkotikum Isofluran tritt die Wirkung nach Sekunden ein. Für die länger andauernden operativen Eingriffe wurden die Tiere zuerst mit einer kurzen Inhalationsnarkose betäubt. Darauf erfolgte die intramuskuläre Injektion von Ketamin (1mg/1kg KGW i.m.) in Kombination mit Xylazinhydrochlorid (0,1mg/1kg KG i.m.).

Die Narkoseinduktion mit Kurznarkosen über ein inhalatives Narkotikum und die Erhaltung der längerandauernden Narkosen durch die gleichzeitige Gabe der zwei Injektionsnarkotika Ketamin und Xylazin bieten den Vorteil der bedarfsangepassten Narkoseführung.

2.1.2.2 Operationsvorbereitung

Die narkotisierten Tiere wurden im Bereich des Thorax und Abdomens rasiert und in Rückenlage auf dem Operationsfeld fixiert. Auf eine intraoperative Antibiotika-Prophylaxe wurde verzichtet. Während der gesamten Studie konnten keine klinischen Hinweise auf Infektionen festgestellt werden.

2.1.2.3 Operatives Vorgehen

2.1.2.3.1 Vorbereitung des Empfängertieres

Nach Erreichen einer adäquaten Narkosetiefe erfolgte die mediane Laparatomie. Das Darmkonvolut wurde in mit Kochsalzlösung getränkten Kompressen nach extra-abdominal mobilisiert.

Die großen Bauchgefäße, *Aorta abdominalis* und *Vena cava caudalis* wurden dargestellt und caudal des Abganges der Nierengefäße mit Haltefäden aus Perma-Handseide® (schwarz, geflochten, 4-0) umschlungen und damit abgebunden. In die so freigelegten Gefäße wurde mittels einer mikrochirurgischen Schere eine Inzision gesetzt. Die für die Anastomose verwendete Nadel-Faden-Kombination, Prolene® (0,5 metric, 7-0) wurde mit dem ersten Stich an den Gefäßen befestigt, um so die Positionierung des Transplantates zu erleichtern.

2.1.2.3.2 Entnahme des Transplantates

Parallel wurde das Spendertier betäubt (Isofluran, *per inhalationem*) und das Herz entnommen. Hierbei wurden nach medialer Laparatomie und anschließender Durchtrennung des Zwerchfells sämtliche Rippen möglichst weit dorsal durchtrennt und das Herz freigelegt. Alle Gefäße des Herzens wurden bis auf den *Truncus pulmonalis* und die *Aorta descendens* mit Perma-Handseide® ligiert. Die großen Gefäße, mit denen das Transplantat an die abdominalen Gefäße des Empfängertieres anastomosiert werden sollte, wurden mit einem schnellen Scherenschlag möglichst gerade durchtrennt. Ab diesem Zeitpunkt begann die Ischämiezeit. Das entnommene Herz wurde mit ca. 3-5 ml der jeweiligen Pufferlösung (siehe Gruppendesign) antegrad durch die Aorta perfundiert, wobei sich das Herz entfärbte und die Herzgefäße „ausgewaschen“ wurden. Dabei wurden mit der Kanülenspitze die Klappen, sowohl die Gefäßklappen als auch die Atrioventrikularklappen, zerstört. Das Herz wurde während der Ischämie bei 4° C in mit isotoner Ringer-Lösung getränkter Gaze feucht gehalten.

2.1.2.3.3 Transplantation

Das entnommene Herz wurde nun nach der Technik von Ono et al. [76] modifiziert nach Schmid [111] mittels mikrochirurgischer Technik End-zu-Seit caudal der Nierengefäße an die großen Bauchgefäße des Empfängertieres angeschlossen. Hierbei wurde die Spenderaorta mit der *Aorta abdominalis* und der *Truncus pulmonalis* des Transplantates mit der *Vena cava caudalis* des Empfängers anastomosiert.

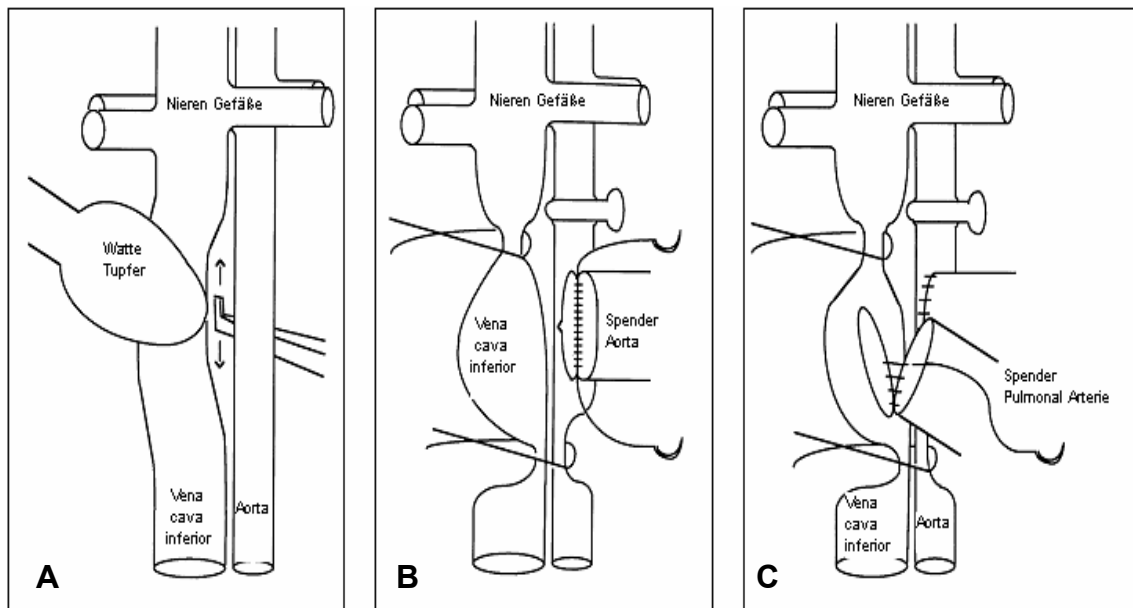


Abb. 7: Chirurgische Technik der heterotopen Herztransplantation: Nach der Separation der Gefäße caudal der Nierengefäße (A) wird die Spenderaorta an die Empfängeraorta (B) und die pulmonal Arterie des Spenders an die Vena cava inferior anastomosiert (C).

Dabei wurde jeweils eine fortlaufende Naht in der Technik nach Schmieden benutzt, die nur zwischen dem ersten und letzten Stich verknotet wurde. Nach Freigabe der Blutzirkulation füllten sich die Koronarien sofort mit Blut und innerhalb der ersten Minute begann das Herz spontan zu schlagen.

Mit der Reperfusion des Transplantats endete die Ischämiezeit des Transplantates, die je nach Protokoll der Studie ca. 25 Minuten bzw. 45 Minuten dauerte. Anschließend wurde die Bauchdecke des Tieres zweischichtig vernäht (die Naht des *Musculus rectus abdominis* und die Hautnaht erfolgten mit 3/0 Vicryl®-Fäden).

Während der Operation kam es durch das Abklemmen der großen Bauchgefäße zu einer Ischämie bei dem Empfängertier (Studie 1 ca. 35 Minuten/ Studie 2 ca. 55 Minuten). Davon waren allerdings alle wichtigen Organe ausgenommen und es kam nur zur Minderdurchblutung der Beckenhöhle und der Hinterbeine. Dabei konnte bei einigen Tieren als einzige Komplikation eine Thrombembolie der Hintergliedmaßen festgestellt werden, die nur zu einer kurzfristigen Beeinträchtigung der Motorik der Hintergliedmaßen geführt hat.

2.1.2.3.4 Blutflußrichtung im Transplantat

Nach erfolgter Transplantation wurde das arterielle Blut dem Transplantat via *Aorta abdominalis* dem Aortenstumpf zugeführt. Der linke Vorhof und die linke Kammer

wurden retrograd gefüllt und die Koronarien, die direkt oberhalb der Semilunarklappen an der *Aorta* im so genannten *Bulbus aortae* entspringen, wurden gleichzeitig mit dem arteriellen Blut versorgt. Damit war die Sauerstoffversorgung des Herzmuskels durch die Koronarien über das kapillare Bett gegeben. Auf der venösen Seite des Kapillarsystems gelangte das Blut über den *Sinus coronarius* in den rechten Vorhof und danach in den rechten Ventrikel. Von dort wurde das Blut über die venöse Anastomose über den Stumpf des *Truncus pulmonalis* in die *Vena cava caudalis* geleitet. Damit erhält man in den beiden Herzhälften jeweils ein Pendelblutvolumen. Dies ist ein „non-working heart model“, da das Transplantat nicht physiologisch perfundiert wird und nicht gegen den physiologischen Druck arbeitet. Dies ist seit der Erstbeschreibung durch Ono et al. 1996 das Standardmodell zur Untersuchung der immunologischen Phänomene der Transplantatabstoßung an der Ratte.

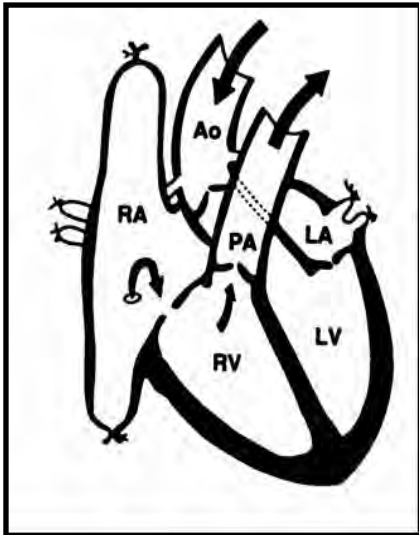


Abb. 8: Die Blutflußrichtung im Transplantat: Es kommt zu einer arteriellen Versorgung der Koronargefäße über die Aorta des Empfängers (Ao). So entsteht in den Kammern ein Pendelblutvolumen (aus: *Handbook of Animal Models in Transplantation Research*, Donald V Cramer et al.1994). Der venöse Abfluß der Koronarien erfolgt über den rechten Vorhof (RA) in den rechten Ventrikel (RV) über die Pulmonalarterie (PA) in die vena cava des Empfängers. .

2.1.3 Postoperatives Monitoring

2.1.3.1 Transplantatfunktion

Die Funktion des Transplantates wurde postoperativ durch tägliche Palpation überprüft und dokumentiert, wobei die folgend international anerkannte Gradeinteilung benutzt wurde: Score von 0 (=keine spürbare mechanische Herzaktivität) bis 3 (=kräftige rhythmische Herzaktion) [112] (siehe unter Auswertung: Funktion des Transplantates).

2.1.4 Gruppendesign

2.1.4.1 Studie 1: Akute Transplantatabstoßung und c3Ado

Randomisiert wurden die Tiere auf zwei Hauptgruppen (n=16/Gruppe) verteilt. Bei allen Tieren wurde die Transplantation wie unter 2.2 Herztransplantation beschrieben durchgeführt und die Ischämiezeit des Herzens wurde so kurz wie möglich gehalten. Dies ergab Ischämiezeiten von ca. 25 min ($24,7 \pm 2,1$ vs. $24,3 \pm 2,6$ / Mittelwerte \pm Standardabweichung). Die Tiere in Gruppe 1 blieben postoperativ unbehandelt und stießen damit die Transplantate in akuter Art und Weise ab. Diesen Tieren wurde nun eine zweite Gruppe gegenübergestellt, die postoperativ 5mg/kg/KGW c3Ado (gelöst in isotoner NaCl Lösung)) zur Immunmodulation 2xtäglich s.c. erhielten. Je nach Untersuchungsziel wurden die Herzen zu verschiedenen Zeitpunkten entnommen. Zuerst wurde als klinischer Parameter das Transplantatüberleben in beiden Gruppen bestimmt (Gruppen 1a und 2a (n=4 pro Gruppe)). Danach wurden zur immun-histologischen und molekular-biologischen Auswertung jeweils am Tag 1, 3 und 6 *post Transplantationem* Herzen entnommen (Gruppen 1b und 2b (n=4 pro Tag und Gruppe)).

Gruppe	Behandlung
1a) Akut (survival)	Keine Behandlung
2a) C3Ado (survival)	Alle 12h 5mg/kg/KGW c3Ado s.c.
1b) Akut (Tag 1,3 und 6)	Keine Behandlung
2b) C3Ado (Tag 1,3 und 6)	Alle 12h 5mg/kg/KGW c3Ado s.c.

2.1.4.2 Studie 2: Akute Transplantatabstoßung und Inhibition der Transkriptionsfaktoren STAT-1 und AP-1

In dieser Studie wurde die Bindung von Transkriptionsfaktoren an die DNA mittels der Decoy-Technologie spezifisch gehemmt. Die Decoys wurden von dem Institut für Physiologie und Pathophysiologie, Leiter Prof. Dr. Markus Hecker, der Georg-August-Universität Göttingen zur Verfügung gestellt. Dazu wurden aus einsträngigen Oligodesoxynukleotiden (ODN), die in ihrer Sequenz der Bindungsstelle des Transkriptionsfaktors entsprechen, Doppelstränge hybridisiert und erst mittels PCR auf ihre Reinheit und dann *in vitro* auf ihre Effektivität geprüft. Hierbei handelte es sich um „nackte“ DNA, d.h., dass es zu keinerlei Verpackung oder Veränderung der DNA-

Sequenzen kommt. Anhand der *In-vitro* Vorversuche und der vorangegangenen *In-vivo* Erfahrung [113] [34] sollten diese Decoys die Bindungsstellen der Transkriptionsfaktoren spezifisch blockieren und damit die Hochregulation der Gene, die normalerweise von diesem Transkriptionsfaktor angesprochen werden, inhibiert werden (siehe Abb. 9).

Stimulus (IFN)

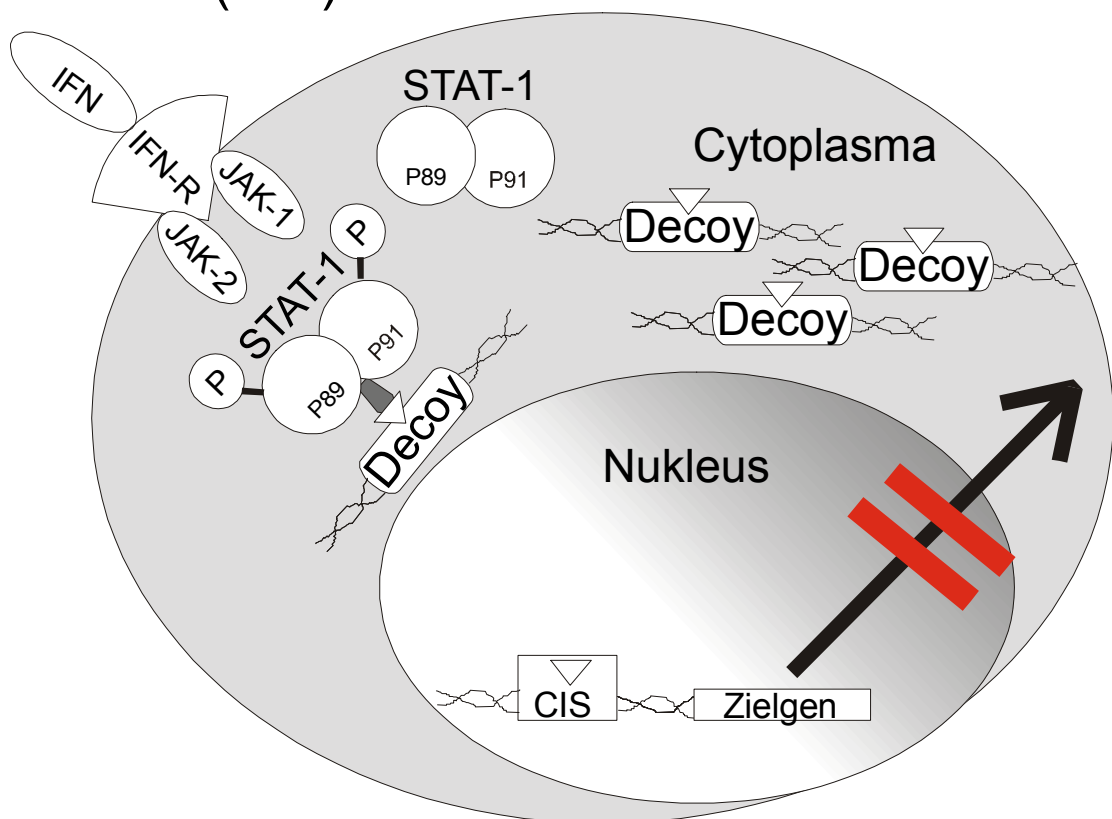


Abb. 9: Wirkungsprinzip der Decoy-Technologie: Durch die Bindung eines der im Cytoplasma angereicherten Decoys an der Bindungsstelle des aktivierten Transkriptionsfaktors (hier am Beispiel STAT-1, aktiviert durch die Bindung von INF über die Phosphorylierung durch die Januskinasen (JAK-1 und 2)) wird dessen Bindung an der Promotorregion (mit CIS gekennzeichnet) inhibiert. Damit kommt es nicht zu der Regulation der Transkription des Zielgens.

Wieder wurden randomisiert Tiere auf die verschiedenen Gruppen verteilt. Die Ischämiezeit wurde diesmal bei allen Operationen auf 45 Minuten warme Ischämie genormt. Dies ist von Bedeutung, damit die Decoys von aktiven Transportmechanismen in die Zelle aufgenommen werden können [113] [34]. In der ersten Gruppe wurden die Herzen während dieser Phase mit in 4ml isotoner Ringer-Lösung aufgelösten STAT-1 Decoys (STAT-1 cons) perfundiert (2a und 2b). In der zweiten Gruppe wurden die

gelösten AP-1 Decoys (AP-1 cons) ins Herz eingebracht (3a und 3b) und auch wieder über die genormte Zeitspanne über einwirken gelassen. Als Kontrollgruppe dienten Tiere, deren Herzen nur mit der Pufferlösung perfundiert wurden (1a und 1b). Um bei dem Parameter des Transplantatüberlebens (survival-Gruppen = Gruppen 1-5a) den Effekt sicher auf die spezifische Inhibition des Transkriptionsfaktors zurückführen zu können, wurden als zusätzliche Kontrollen in der Sequenz veränderte ODN-Decoys (STAT-1 mut (4a) und AP-1 mut (5a)) als direkte Kontrolle eingesetzt (n=5). Für die immunhistologischen und molekularbiologischen Untersuchungen wurden wieder die Herzen am Tag 1, 3 und 6 nach Transplantation entommen und die Transplantate von spezifisch gehemmten Tieren mit den nur mit Pufferlösung perfundierten Tieren verglichen (n=5 pro Tag und Gruppe, Gruppe 1-3b).

Gruppe	Behandlung
1a) Puffer (survival)	Perfusion mit Pufferlösung
2a) STAT-1(survival)	Perfusion mit in Puffer gelösten STAT-1 Decoys
3a) AP-1(survival)	Perfusion mit in Puffer gelösten AP-1 Decoys
4a) STAT-1mut (survival)	Perfusion mit in Puffer gelösten mutierten STAT-1 Decoys
5a) AP-1 mut (survival)	Perfusion mit in Puffer gelösten mutierten AP-1 Decoys
1b) Puffer Tag 1,3, 6	Perfusion mit Pufferlösung
2b) STAT-1 Tag 1,3, 6	Perfusion mit in Puffer gelösten STAT-1 Decoys
3b) AP-1 Tag 1,3, 6	Perfusion mit in Puffer gelösten AP-1 Decoys

Die Decoys hatten die Sequenz:

STAT-1 consensus	5'-CATGTTATGCATATTCCTGTAAGTG-3'
STAT-1 mutiert	5'-CATGTTATGCAGACCGTAGTAAGTG-3'
AP-1 consensus	5'-CGCTTGATGACTCAGCCGGAA-3'
AP-1 mutiert	5'-CGCTTGATTACTTAGCCGGAA-3'

Die Decoys wurden in einer Konzentration von 10µM/ml eingesetzt. Diese Konzentration war angelehnt an frühere Studien [113] [34] und sollte auf der einen Seite gewährleisten, dass genügend Decoys in der Zelle angereichert werden, um einen Effekt zu erzielen, aber auf der anderen Seite nicht so gewählt sein, dass es durch eine Übersättigung mit Decoys zu unspezifischen Reaktionen kommt.

2.2 Technik der Asservation

Zuerst wurden die Überlebensdaten der verschiedenen Gruppen ermittelt. Daneben wurden mit dem Ziel *In-vitro* Daten zu erheben, die Transplantate von separat operierten Tieren zu definierten Zeitpunkten entnommen. Die Entnahme dieser Transplantate erfolgte an den Tagen 1,3 und 6 nach Transplantation, um sowohl Vorgänge in der Frühphase, im zeitlichen Verlauf der akuten Transplantatabstoßung und letztendlich zum Zeitpunkt des Organverlustes zu erfassen. Unter Isoflurannarkose wurde bei dem auf dem Rücken fixierten Tier ein vom Xiphoid nach kaudal verlaufender, etwa 10 cm langer Schnitt gelegt und das Abdomen eröffnet.

Nach Aufsuchen der Iliakalbifurkation wurde von dort aus die *Aorta abdominalis* kanüliert und die Ratte durch Blutentnahme mit einer Spritze exsanguiniert. Anschließend wurde das transplantierte Herz entnommen und in folgender Weise asserviert:

Das Herz wurde durch Transversalschnitte bis auf die Herzspitze in 3 gleich dicke Scheiben geteilt und mit dem Gewebekleber Tissue-Tek® auf von 1 bis 3 nummerierten Korkplättchen fixiert. Die Präparate wurden vollständig mit Tissue-Tek bedeckt und danach in Isopenthan, einem primären Kryogen, getaucht, welches vorher so lange in flüssigem Stickstoff gekühlt wurde, bis sich Kristalle gebildet hatten (ca. 5-10 min.). Die so asservierten Gewebeschnitte wurden in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und dieses verschraubt in flüssigen Stickstoff gelegt und somit transportfähig gemacht. Die Herzspitze wurde in 4 gleich große Gewebestücke geschnitten und in Safe-Lock-Tubes® 2,0ml in flüssigem Stickstoff gekühlt, um für molekulare Untersuchungen archiviert zu werden. Diese Gewebestücke und die für die Gefrierschnitte vorbereiteten Präparate konnten so über längere Zeit bei -80° C gelagert werden.

2.3 Histologische Aufarbeitung

Für die histopathologischen und die immunhistochemischen Färbungen wurden mittels eines Kryostaten Gefrierschnitte mit einer Dicke von 6µm hergestellt. Diese wurden für 10 Minuten in 4°C kaltem Aceton fixiert und dann bis zur entgültigen Färbung bei – 20°C gelagert.

2.3.1 Standardfärbung

Für die histopathologische Beurteilung wurde eine Standardfärbung mit Hämatoxylin und Eosin an den 6µm dünnen Gefrierschnitten durchgeführt. Außerdem wurden die

Gefrierschnitte mit der Elastica spezifischen van-Gieson-Färbung (Resorchin-Fuchsin) versehen. Mit dieser Färbemethode können insbesondere Strukturen wie die *Membrana elastica interna* dargestellt werden. Die Präparate wurden mit einem Standard-Lichtmikroskop untersucht

2.3.2 Immunhistochemische Färbung

In diesen Studien fanden folgende Primärantikörper Verwendung:

Primärantikörper	Hersteller
Mouse monoclonal anti-rat intercellular adhesion molecule- (ICAM)-1	Seikagaku, Tokyo, Japan
Goat polyclonal anti-human vascular cell adhesion molecule-(VCAM)-1	Santa Cruz, Santa Cruz,USA
Mouse monoclonal anti-rat MHC II	Serotec, Oxford, England
Mouse- monoclonal anti-rat ED 1	Serotec, Oxford, England
Mouse monoclonal anti-rat R73, TCR alpha/beta	Serotec, Oxford, England
Rabbit polyclonal anti-rat iNOS	Santa Cruz, Santa Cruz,USA

Für die immunhistochemischen Färbungen wurde die hochsensitive APAAP (Alkalische Phosphatase-Anti-Alkalische Phosphatase) -Methode in einer modifizierten Version nach J.L. Cordell angewendet.

Das Prinzip dieser Färbung besteht in der Verstärkung des Signals einer spezifischen Antikörperbindung. Antikörper dienen im Rahmen der Immunantwort dazu, an spezifische fremde Proteine zu binden und damit diese den Abwehrzellen zu präsentieren. Diese Bindung macht man sich bei der Immunhistochemie zu Nutze. Dazu wählt man zuerst einen spezifischen Primärantikörper gegen das zu detektierende Protein. Diese Antikörper entstammen einer anderen Tierart, in dieser Studie meistens aus Mäusen. Um ein sichtbares Signal zu erhalten, verwendet man einen enzymgekoppelten Antikörper (hier alkalische Phosphatase), der eine Färbereaktion katalysieren kann (APAAP-Komplex). Um nun die Bindung des APAAP-Komplexes zu ermöglichen (diese markierten Antikörper binden an Maus- und Kaninchenproteine), wählt man einen zweiten Antikörper aus, der den Primärantikörper mit dem APAAP-Komplex verbindet. In der Studie wurde hierfür der rabbit anti mouse IgG-Antikörper

gewählt, der wegen seiner Funktion als „Brückenantikörper“ bezeichnet wird. An diesen Brückenantikörper binden im nächsten Inkubationsschritt die Antikörper aus dem APAAP-Komplex, die mit ihrem Enzym (Alkalische Phosphatase) gekoppelten Ende dann die eigentliche Färbereaktion katalysieren können.

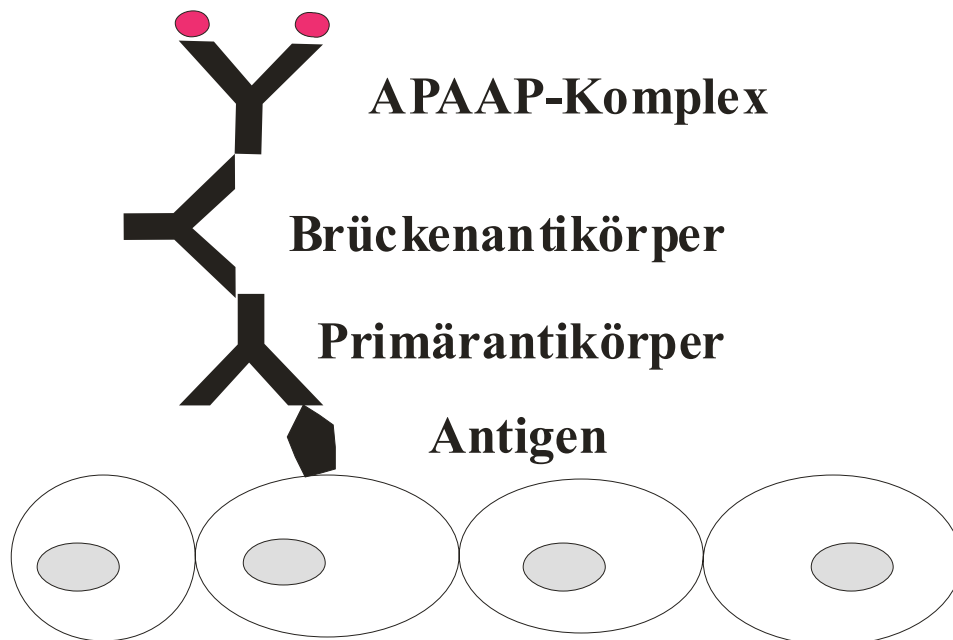


Abb. 10: Das Prinzip der Immunhistochemie mit der APAAP-Methode: Ein spezifischer Primärantikörper bindet nach der Inkubation an dem zu detektierenden Antigen. Um die Bindung des Enzym-gekoppelten APPAP-Komplexes (Enzym= Alkalische Phosphatase) zu ermöglichen, wird das Gewebe mit einem zweiten, dem sog. Brückenantikörper, inkubiert. Dieser Antikörper besitzt einerseits eine Bindungsstelle für die Spezies des Primärantikörpers und ermöglicht zum anderen die Bindung des APAAP-Komplexes. Durch die Bindung des Enzym-gekoppelten APAAP-Komplexes kann dann letztendlich eine Färbereaktion ermöglicht werden.

Ist der erste Antikörper aus einer anderen Spezies, benötigt man einen zusätzlichen Antikörper, der mit seinen Bindungsstellen an den Primärantikörper und den Brückenantikörper binden und damit beide verbinden kann (in der Studie mouse anti goat IgG für den Primärantikörper VCAM-1 und mouse-anti-rabbit IgG für den Primärantikörper iNOS). Um unspezifischen Bindungen vorzubeugen, wird das Gewebe mit Rattenserum inkubiert.

Zur genauen Technik: Zunächst wurden die 6 µm dicken, azetonfixierten Gefrierschnitte 45 Minuten lang bei Raumtemperatur mit der Primärantikörperlösung inkubiert:

Primärantikörper:	Verdünnung:
ICAM-1 1,0mg/ml	1:75
VCAM-1 200µg/ml	1:20
MHC II 9,5mg/ml	1:10
ED-1 1,0mg/ml	1:150
R73 1,0mg/ml	1:75
iNOS 1,0mg/ml	1:500

Um die nicht gebundenen Antikörper von dem Gewebe zu entfernen, wurden die Objektträger in Tris-Puffer geschwenkt (Waschschritte, 4fach wiederholt).

Nach dem Waschen wurden die Schnitte nun ebenfalls bei Raumtemperatur für 20 Minuten mit einem sekundären Antikörper inkubiert: es wurden rabbit-anti-mouse-IgG-Brückenantikörper (1:200) zum Nachweis von ICAM-1, MHC II, ED-1, R73 und mouse-anti-goat-IgG zum Nachweis von VCAM-1 (1:300) sowie mouse anti rabbit IgG zum Nachweis von iNOS (1:500) hinzugegeben. Bei Bedarf wurde zusätzlich mit einem Verbindungsantikörper inkubiert: rabbit anti mouse -IgG in den Konzentrationen 1:400 zum Nachweis von VCAM-1 und 1:200 zum Nachweis von iNOS. Zur Vermeidung unspezifischer Bindungen wurde den primären und sekundären Antikörperlösungen verdünntes Rattenserum (1:750) zugesetzt. Nach erneutem Abwaschen der überschüssigen Antikörper (4-fache Wiederholung der Waschschritte) erfolgte die Zugabe des APAAP-Komplexes (1:50) für 20 Minuten bei Raumtemperatur. Um die antikörpermarkierten Zellen sichtbar zu machen, wurden die Präparate für 30 Minuten in eine neufuchsinhaltige Lösung gegeben, in der die Färbereaktion stattfand. Diese Färbelösung bestand aus 3 verschiedenen Lösungen, die frisch zusammengegeben wurden.

Färbelösung:

Lösung 1 Entwicklerlösung (für 60ml bestehend aus 2 Lösungen)		
1. Lösung (44ml)	4,9g Tris Base	
	1,5 g Tris HCL	
	8,7 g NaCl	
	ad 1l Aqua bidest	=> pH 8.7 mit 1N HCL
2. Lösung (15,5ml)	25mg Aminomethylpropandiol	
	ad 1l Aqua bidest	
Lösung 2:	31 mg Naphtol-As-Bi-Phosphat	
	375µl Dimethylformamid	
Lösung 3:	12,8 mg Na-Nitrit	
	320µl Aqua bidest	
	5g Neufuchsin	
	100ml 2N HCL	

Zum Ansatz der Färbelösung: Die Lösungen werden frisch zusammengegeben, da es sonst zum Zerfall der Farbstoffe kommt. Der pH-Wert wurde auf 8.7 eingestellt. Die Färbelösung wurde vor dem Gebrauch filtriert. Die Färbezeit der Objektträger betrug 30 Minuten.

Durch die Phosphatgruppe am AAPAP-Komplex wurde hierbei eine Neufuchsin-Diazo-Farbreaktion katalysiert. Nach anschließender Spülung wurde mit Hämalaun® (2 Minuten) gegengefärbt.

Je nach Antikörper dienten entweder Schnitte von mit über 8 Stunden mit LPS perfundierten Herzen (ICAM-1,VCAM-1,MHC II, ED1,iNOS) oder Gewebeschnitte von einer Rattenmilz (TCR Alpha/Betha) als positive Färbekontrolle. Die mit LPS perfundierten Herzen stammten aus einer vorangegangenen Studie der Arbeitsgruppe Braun-Dulaeus et al. [101]. Die Milz wurde von einem Spendertier entnommen und die Gefrierschnitte wurden in gleicher Weise erstellt wie bei dem Herzgewebe.

2.4 Molekularbiologische Untersuchungen

2.4.1 Quantifizierung von mRNA durch die semi-quantitative Reverse-Transkriptase (RT) Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR):

2.4.1.1 RNA Isolierung

Die RNA- Isolierung erfolgte nach der Methode von Chomczynski und Sacchi [114] mit dem Roti-Quick-Kit gemäß den Angaben des Herstellers.

Dieser Kit besteht aus drei Lösungen. Die Lösung 1 enthält Guanidinthiocyanat und führt zur Cytolyse und zum Freiwerden der Zellkerne. Die Lösung 2 enthält ein Phenol/Chlorophorm-Gemisch, welches in einer Phasentrennung die DNA extrahiert. In der Lösung 3 ist Isopropanol enthalten, dies fällt die DNA wieder aus der Lösung aus.

Zur RNA-Extraktion aus dem Gewebe wurde ein Stück der archivierten Herzspitze in flüssigem Stickstoff mit einem sterilen Mörser pulverisiert. Darauf wurden die Zellen lysiert durch die Zugabe von 900µl Lösung 1 (Guanidinthiocyanat) und die Proben wurden 10 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurden die schweren Bestandteile abzentrifugiert (12000rpm, 15 Minuten bei 4°C), der Überstand wurde abgenommen und in ein neues Eppendorf Tube® überführt. Nun wurde 1ml Roti-Quick-Lösung 3 dazugegeben und nach kurzem Schwenken wurde die Lösung für mindestens 2 Stunden bei -80° C eingefroren. Direkt nach dem Auftauen wurde die Lösung wieder zentrifugiert (14000rpm, 15 Minuten bei 4°C) und je 300µl Roti-Quick 1 und Roti-Quick 3 dazugegeben, um nun die DNA von der RNA zu trennen. Erneut mussten die Proben für mindestens 1 Stunde bei -80° C tiefgefroren werden. Danach kam ein weiterer Zentrifugationsschritt (14000rpm, 15 Minuten bei 4°C) und der Überstand wurde komplett verworfen. Das Pellet wurde nun noch mit 70% Ethanol versetzt und damit die RNA aufgereinigt. Danach konnte es mit 20-25µl destilliertem, RNase-freiem Wasser gelöst und die RNA bei -80°C gelagert werden.

2.4.1.2 Bestimmung der RNA-Konzentration

Hierfür wurde die optische Dichte (O.D.) der zu messenden RNA- Lösung bei 260nm und 280 nm photometrisch bestimmt. Die O.D._{260nm} gibt den Nukleinsäure-Gehalt der Lösung an, während die O.D._{280nm} den Proteingehalt misst. Der Quotient zwischen beiden optischen Dichten ist somit ein Maß für die Reinheit der RNA-Isolierung und sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Aus der O.D._{260nm} einer Lösung wurde die

Konzentration an RNA wie folgt bestimmt:

$$\text{O.D.}_{260\text{nm}} \times 0,04 = \text{RNA Konzentration in } \mu\text{g}/\mu\text{l}$$

2.4.1.3 Herstellung der cDNA (copy-DNA)

Aus einer genormten Menge (1 μ g) der so gewonnenen RNA wurde nun für die Vervielfältigung mit der PCR eine cDNA hergestellt. Um diese zu synthetisieren, benötigt man ein Enzym, die Reverse Transverase (RT), die RNA in die entsprechende DNA-Sequenz umschreiben kann. Ferner die DNA-Grundbausteine, die verschiedenen Nucleinsäurebestandteile (dNTP's), bestehend aus dATP, dCTP, dGTP und dTTP. Dadurch erhielt man ein der aus dem Gewebe entnommenen RNA entsprechendes Gemisch aus DNA-Produkten, aus dem die zu detektierenden Sequenzen mit der PCR amplifiziert werden konnten.

Zur Technik: Die in aqua dest. gelöste RNA wurde zuerst bei 65°C in einem Thermozykler inkubiert. Dabei lösen sich die leichten Bindungen zwischen den RNA-Sequenzen und die RNA ist somit für die Reaktion aufgeschlossen. Danach wurde der RT-Mix wie folgt hergestellt:

RT-Mix	Volumen pro Probe
Random Primer	3 μ l
Puffer 5x	10 μ l
dNTP's (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 10mM)	2 μ l
0,1 M DTT	5 μ l
Rnasin	1 μ l
RT	2 μ l

Das RNA-Wasser-Gemisch wurde mit 23,8 μ l RT-Mix erst eine Stunde bei 37°C, dann 10 Minuten bei 95°C im Thermozykler inkubiert, damit die Reaktion stattfinden kann. Die so hergestellte cDNA wurde bis zur PCR-Analytik bei -24°C aufbewahrt.

2.4.2 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die PCR ist eine Methode zur Amplifikation definierter DNA Fragmente [115]. Hierbei werden pro Sequenz (Zyklus genannt) jeweils spezifische DNA-Sequenzen verdoppelt,

indem aus den Grundbausteinen (dNTP's) durch das Enzym (taq-Polymerase) DNA Stränge synthetisiert werden. Das Enzym benötigt zum Start der Synthese eine Anfangssequenz, den sog. Primer. Damit ist es möglich, durch den Einsatz des spezifischen Primers eine bestimmte DNA-Sequenz zu markieren und zu synthetisieren. Durch die mehrfache Vervielfältigung erhält man damit eine DNA-Menge, die optisch detektierbar und quantitativ auswertbar ist.

Für die PCR wurde folgender Mix hergestellt:

Für das sog. Housekeeping-Gen (siehe Seite 42) Porphobilinogen Deaminase (PBGD):

PCR-Mix	Volumen pro Probe
H ₂ O	19 µl
10x Taq	2.5 µl
dNTP's	2.5 µl
3' Primer	1.0 µl
5'Primer	1.0 µl
Taq	0.15 µl

Für alle anderen Primer

PCR-Mix	Volumen pro Probe
H ₂ O	16 µl
10x Taq	2.5 µl
dNTP's	2.5 µl
3' Primer	2.5 µl
5'Primer	2.5 µl
Taq	0.15 µl

Jeweils 2µl der c-DNA wurde zusammen mit 23,8 µl von dem PCR-Mix in einem Thermozykler amplifiziert.

PCR-Produkt-Größen, Zykluszahl und Annealing Temperatur sind folgende:

Ratten Primer	Sequenz der Primer	Annealing Temperatur	Anzahl der Zyklen	PCR- Produkte	Literatur- quelle
IL-2	5'- CAG GAT GGA GAA TTA CAG GAA CCT -3' 5'- AAA TCC AGA ACA TGC CGC A -3'	60°C	35	156	Freundliche Gabe von Dr. Randolf, Universität Marburg
MCP-1	5'- ATG CAG GTC TCT GTC ACG -3' 5'- CTA GTT CTC TGT CAT ACT -3'	55°C	32	447	Taal, 2000 [108]
ICAM-1	5'- CAA CTG GAA GCT CTT CAA GCTG -3' 5'- TAG TCG GAA GAT CGA AAG TCCG -3'	60°C	27	428	Segel, 2002 [109]
VCAM-1	5'- CAA GGG TGA CCG TCT CAT GA -3' 5'- TGT GCA GCC ACC TGA GAT CC -3'	60°C	25	519	Segel, 2002 [109]
PBGD	5'- CAA GGT TTT CAG CAT CGC TACCA -3' 5'- ATG TCC GGT AAC GGC GGC -3'	59°C	35	135	Grandel, 2000 [110]

Thermozyklerdaten für alle Primer:

95°C für 4 Minuten, 95°C für 45 Sek., Annealing-Temperatur und Zeit siehe oben,
72°C für 1 Minute, 72°C für 4 Minuten.

Für das Housekeeping- Gen PBGD gelten folgende Daten: 95°C für 6 Min., 95°C für 20
Min., 59°C für 30 Sek., 73°C für 7 Min., 73°C für 7 Min.

2.4.2.1 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA- Fragmenten

In der Gelelektrophorese-Kammer wurden die DNA-Fragmente gemäß ihrer Größe in
einem elektrischen Feld aufgetrennt. Dafür wurden 10µl der PCR-Probe mit 10µl
Ladepuffer (gel loading solution) gemischt und auf ein 4%iges Agarose Gel (4,8g

Agarose Gel + 120 ml 1x TAE-Puffer) aufgetragen. Für die Detektion wurde das Agarose Gel versetzt mit 4µl Ethidiumbromid (1%), dies ist eine fluoreszierende Substanz, die in die DNA eingebaut wird und so als Marker fungiert. Um die Produktgröße zu erfassen wurde ein Gemisch aus bekannten DNA-Fragmenten (4µl DNA/ Hinf I –Markers 1mg/ml) als sog. „Leiter“ mitgeführt. Die Laufbedingungen waren 1,5 Std., bei 100 V in TAE- Puffer. Danach erfolgte die quantitative densitometrische Auswertung der Produkte. Unter ultraviolettem Licht mit dem Bio-Imaging Analyzer wurde die Intensität (=Helligkeit) der Banden sichtbar gemacht und in elektronische Daten umgewandelt.

2.5 Nachweis von Apoptose

2.5.1 DNA-Laddering

Die DNA wurde aus dem Herzgewebe mittels des DNA-Laddering-Kit nach Anweisung isoliert. In Kürze:

Das Gewebe wurde unter ständiger Kühlung durch flüssigen Stickstoff im Mörser pulverisiert und durch 200µl Lysis Lösung 1 für 2 Stunden bei -80° aufgeschlossenen (Lyse der Zellen). Danach wurde 700µl Extraction Solution 2 und 400µL Extraction Buffer 3 dazugegeben und bei 12.000g für 5 Minuten zentrifugiert, um die DNA mittels einer Phasentrennung zu extrahieren. Der Überstand wurde abgenommen und ein Zehntel des so gewonnenen Volumens Natriumacetat dazugegeben. Daraus wurde ein 1:1-Gemisch mit 2-Propanol hergestellt und dieses über Nacht bei -20° inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Gemisch bei 12.000g für 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das dadurch gewonnene DNA-Pellet wurde durch mehrfache Zentrifugationsschritte mit 70% Ethanol aufgereinigt und in DNase-freiem Wasser gelöst. Nach der Quantifizierung wurden 10µg dieser DNA auf ein 1,5 %iges Agarosegel aufgetragen (3 Stunden bei 80V) und durch das im Gel gelöste Ethidiumbromid (1%) mit einem UV-Luminometer sichtbar gemacht.

2.5.2 TUNEL-Assay

In diesem Verfahren wurden die beim programmierten Zelltod spezifisch entstehenden DNA-Bruchstücke an ihrem freien 3'-OH-Ende durch das Enzym Terminal-deoxynucleotidyl-transferase mit speziell markierten Nucleotid-Sequenzen (TUNEL-Reaktion) markiert. Für diesen Nachweis wurde der in situ cell death detection Kit

verwandt. Durch diesen Kit können die mit Fluoreszin markierten Nucleotide in den Zellen direkt unter einem Fluoreszenzmikroskop (Wellenlänge: 450-500nm) nachgewiesen werden.

Dabei wurde nach dem Anwendungsprotokoll des Herstellers vorgegangen. Die für 20 Minuten in 4% Paraformaldehyd fixierten 6µm dicken Gefrierschnitte wurden erst für 2 Minuten in eine 4°C kalte Permeabilisationslösung gestellt (0,1% Triton X® und 0,1% Natrium Citrat) in Phosphat gepuffertem NaCl-Lösung (PBS). Nach mehrfachen Waschschritten (in PBS) wurden die Schnitte mit dem Enzym-Nucleotid-Gemisch in einem Brutschrank für 60 Minuten bei 37°C inkubiert (Tunel-Reaktion). Danach war die Auswertung unter dem Fluoreszenz-Mikroskop möglich.

2.6 Auswertung

2.6.1 1. Funktion des Transplantats

Die Kontraktilität des Transplantates wurde täglich manuell durch die Bauchdecke des Empfängertieres beurteilt. Folgender Score wurde für die Einteilung nach Funktionsgraden herangezogen [112]:

Grad	Transplantatfunktion
0	Keine palpablen Kontraktionen, nach Abdomeneröffnung keine Aktivität des Transplantates mehr zu sehen
1	Minimale palpable Kontraktion, nach Abdomeneröffnung rhythmische Restaktivität zu sehen
2	Rhythmische Kontraktionen palpabel
3	kräftige, rhythmische Kontraktionen palpabel, bei narkotisierten Tieren sieht man das Transplantat durch die Bauchdecke schlagen

2.6.2 Immunhistochemische Auswertung

Wie in 2.3.1. beschrieben, wurden Kryostatschnitte von transplantierten Herzen und als Negativkontrolle von nicht transplantierten Herzen immunhistochemisch gefärbt. Dabei wurden je nach Projekt die behandelten Tiere (Studie 1: c3Ado und Studie 2: die STAT-1- und AP-1-Decoys) einer bis auf die Gabe des Pharmakons bzw. der Decoy gleichbehandelten Gruppe gegenübergestellt. Je nach Antikörper dienten entweder

Schnitte von mit über 8 Stunden mit LPS perfundierten Herzen (ICAM-1, VCAM-1, MHC II, ED1, iNOS) oder Gewebeschnitte von einer Rattenmilz (TCR Alpha/Beta) als positive Färbekontrolle.

2.6.2.1 Adhäsionsmoleküle

Zur Auswertung der Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 wurde an den postkapillären Venolen die Färbung des Gewebes mittels eines Score-Verfahrens in 4 Färbegrade eingeteilt.

Färbegrad	Score (Einteilung)
keine Anfärbung des Endothels	Färbegrad 0
minimale Färbung des Endothels	Färbegrad 1
Mittlere Färbung des Endothels	Färbegrad 2
Massive Färbung des Endothels	Färbegrad 3

Diese Einteilung wurde nun in Prozent pro Tier ausgedrückt und die Mittelwerte der Tiere konnten mit der jeweiligen Kontrollgruppe verglichen werden.

2.6.2.2 Zelluläre Infiltration

Die Immunhistochemie zur Quantifizierung der zellulären Infiltration, bei der verschiedene Zelltypen mittels spezifischer Marker detektiert werden können, erfolgte über die Zählung von 10 unterschiedlichen Gesichtsfeldern (bei einer 400fachen Vergrößerung) in jeweils 2 verschiedenen Herzebenen pro Tier, die randomisiert eingestellt wurden.

2.6.3 Semiquantitative RT-PCR

Der Grad der Genexpression in den Transplantaten wurden durch eine semiquantitative RT-PCR bestimmt.

Die verschieden stark exprimierten mRNAs bzw. deren komplementäre cDNAs wurden bei Verwendung von für die untersuchte Sequenz spezifischen Primern definiert. Hierzu wurde die exprimierte genetische Information in Form von RNA aus Gewebeproben extrahiert und in eine stabile Form, die nicht enzymatisch degradiert werden kann, die cDNA (komplementäre DNA), mit Hilfe des Enzyms Reverse-Transkriptase überführt. Diese cDNA konnte über Monate bei -80°C gelagert werden. Nun wurden Verdünnungsreihen dieser cDNA mit den genspezifischen Primern amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde dann elektrophoretisch aufgetrennt und die Banden der PCR-

Produkte dentiometrisch vermessen.

Zur quantitativen Analyse müssen folgende Voraussetzungen erfüllt sein:

1. Eine ausreichende Anzahl an PCR-Amplifikationszyklen muss eine detektable Menge an PCR-Amplifikationsprodukten erzeugen.
2. Die PCR der Verdünnungsreihe muss sich im linearen Bereich der Amplifikationskurve befinden, d.h. die Verdopplung der Menge an eingesetzter cDNA muss zu einer Verdopplung der Ausbeute an PCR-Amplifikationsprodukt führen.
3. Die Menge an cDNA, die für die PCR-Reaktion verwandt wird, muss aus der gleichen Anzahl von Gewebezellen isoliert worden sein. Um diese Bedingung zu erreichen, wird ein internes Standardgen („*Housekeeping-Gen*“), welches konstant von allen Zellen exprimiert wird, in einem separaten PCR-Ansatz amplifiziert. Anhand der Stärke der Bande des aus diesem Ansatz erstellten Gens kann man das Volumen der gelösten cDNA ermitteln, die repräsentativ für die gleiche Anzahl an Zellen ist. Daraus resultieren die Volumina an cDNA, welche in jeden einzelnen Amplifikationsansatz eingebracht werden müssen und äquivalente Zellzahlen repräsentieren. Bildet man nun einen Quotienten aus der Ausbeute an PCR-Amplifikationsprodukt, gemessen an optischer Dichte der PCR-Amplifikationsbanden, zum internen Standardgen, kann man den relativen Expressionsgrad der Gene unterschiedlicher Proben zueinander semiquantitativ vergleichen.

In dieser Studie wurde als internes Standardgen oder „*Housekeeping-Gene*“ PBGD (Porphobilinogen deaminase) [110] verwendet. Zum Ausschluss von Kontaminationen wurde bei jeder PCR-Amplifikation eine Negativkontrolle mitgeführt. Parallel erfolgte die Positivkontrolle aus Milzgewebe der Ratte bzw. LPS stimulierten Endothelzellen der Ratte, die die Zielgene exprimieren.

2.6.3.1 Verwendung von PBGD als Standardgen

Porphobilinogen deaminase (PBGD) ist ein Enzym, welches an der Synthese von Häm beteiligt ist. Es katalysiert die Synthese von Porphyrinogen, indem es vier Moleküle von Porphobilinogen verbindet [116].

PBGD ist ein ubiquitär und konstant exprimiertes Gen [117], welches als pseudogenfrei beschrieben wird [118]. Pseudogene sind zumeist nicht funktionsfähige Intron lose

Kopien des größten Teiles oder auch des ganzen Gens. Diese Pseudogene stellen für die quantitative RT-PCR-Fragestellung ein Problem dar, da diese Pseudogene in Form von genomischer DNA amplifiziert werden können und diese Amplifikate möglicherweise nicht von den durch RT-PCR generierten PCR-Produkten unterschieden werden können. Dies kann zu falschen Quantifizierungsergebnissen führen [119].

2.6.4 Nachweis der Apoptose

Im Verlauf des apoptotischen Zelltodes wird die DNA in Fragmente gespalten, die alle ein Vielfaches der typischen Histion-Größe darstellen. Damit ließ sich, indem man die isolierte DNA von den apoptotischen Zellen elektrophoretisch trennt, eine typische Leiterstruktur darstellen. Im Gegensatz dazu entstand bei nicht fragmentierter DNA eine ineinander laufende Spur von unterschiedlichsten DNA-Strang-Größen, die sich nicht in sichtbare Banden auftrennten.

Durch den Nachweis von Tunel-positiven Zellen kann man nun die Apoptoserate im Gewebe quantitativ erfassen. Hierbei wurden wieder randomisiert eingestellte Gesichtsfelder durch ein Mikroskop (Vergrößerung 400x) erfasst und insgesamt 10 dieser Gesichtsfelder pro Herzebene (d.h. insgesamt 20 Gesichtsfelder/Tier) ausgewertet. Um nun die Apoptoserate zu erfassen, wurden die Tunel-positiven Kardiomyozyten in Prozent der gesamt gezählten Kardiomyozyten pro Gesichtsfeld ausgedrückt.

2.7 Statistische Methodik

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Statistikprogramm StatsDirect statistical software Version 1.9.8 unter Beratung durch PD. Dr. Peter Schnülle, Medizinische Abteilung IV des Universitätsklinikums Heidelberg.

Aus den Einzelergebnissen jeder Gruppe wurde der statistische Mittelwert und die Standardabweichung ermittelt.

2.7.1 Verwendete Testverfahren:

Der Vergleich der Verum- mit den Kontrollgruppen wurde mit dem Wilcoxon-U-Test nach Mann und Whitney durchgeführt. Dies ist ein Test zum Vergleich zweier unabhängiger Datengruppen.

Mit dem Test wurde auf statistisch signifikante Unterschiede geprüft, bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p=0,05$ als Signifikanzschwelle.

3 Ergebnisse

3.1 *Das Tiermodell*

Ohne immunsuppressive Behandlung kommt es innerhalb von $5,7 \pm 0,5$ (Mittelwert \pm Standardabweichung) Tagen zum Sistieren der Schlagkraft der Transplantate. Dabei schlagen die Herzen in den ersten 3 Tagen noch kräftig und gleichmäßig, danach ist eine kontinuierliche Abnahme der Schlagkraft zu palpieren.

Während der Studie wurden keine klinischen Symptome von Wundheilungsstörungen oder Infektionen festgestellt. Die Tiere erholten sich unabhängig vom Studienprotokoll innerhalb weniger Stunden von der Operation.

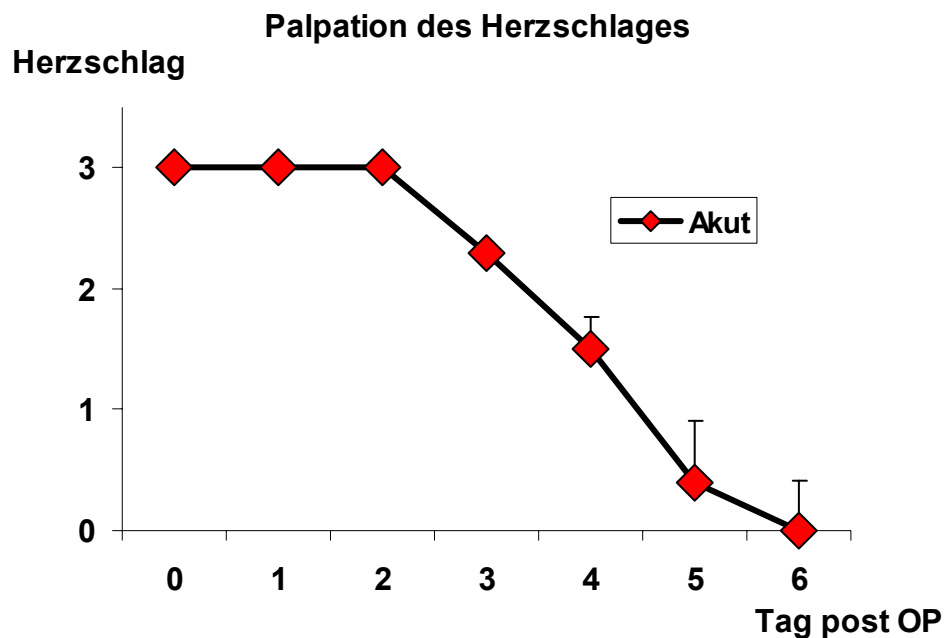


Abb. 11: Die palpierbare Herzaktion der Transplantate bei unbehandelten Tieren (Tage post OP): Die Organe schlagen bis zum 3. Tag stark und regelmäßig und nehmen dann bis zum 6. Tag deutlich an Schlagkraft ab. Dargestellt sind die Mittelwerte der Transplantate \pm Standardabweichung ($n=4$).

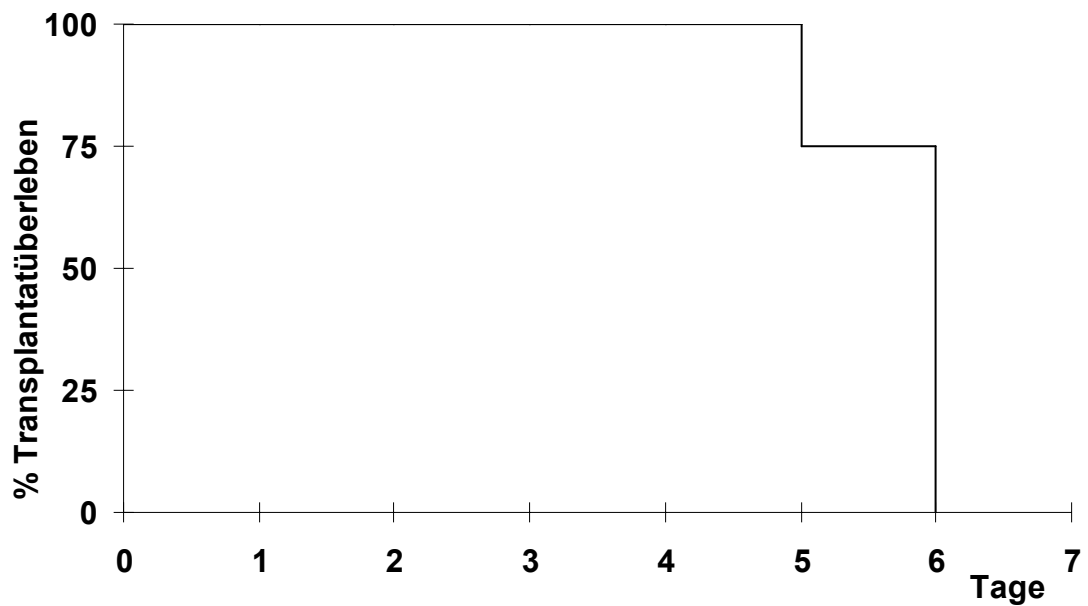


Abb. 12: Transplantatüberleben bei unbehandelten Tieren (Tage post OP): Die Organe werden innerhalb von $5,7 \pm 0,5$ Tagen abgestoßen. Dargestellt sind die absoluten Zahlen der schlagenden Transplantate in Prozent zu der Gesamtzahl der Tiere ($n=4$).

3.1.1 Histologische, immunhistochemische und molekular-biologische Charakterisierung des Akuten Abstoßungsmodelles

Im Rahmen des zeitlichen Verlaufs der akuten Abstoßung kam es histologisch zu einer progredienten Infiltration mit mononukleären Zellen. Im Zeitverlauf zeigte sich am ersten Tag bei einigen Gefäßen eine leichte Perivaskulitis, d.h. es reichern sich Entzündungszellen im umliegenden Gewebe der Gefäße an. Außerdem war eine leichte Ödematisierung des Gewebes zu sehen. Am dritten Tag konnten schon regelrechte Infiltratstraßen im Gewebe des Transplantates beobachtet werden und bei fast allen Gefäßen zeigte sich nun eine deutlich ausgeprägte Perivaskulitis. Am 6. postoperativen Tag fielen histologisch große Areale auf, in denen kein physiologisches Herzgewebe mehr zu erkennen war. Anstatt der Kardiomyozyten sah man teils fibrotische, teils nekrotische Bezirke und weite Teile des Gewebes waren ödematisiert. In dem gesamten Gewebe war eine große Anzahl an mononukleären Zellen eingewandert.

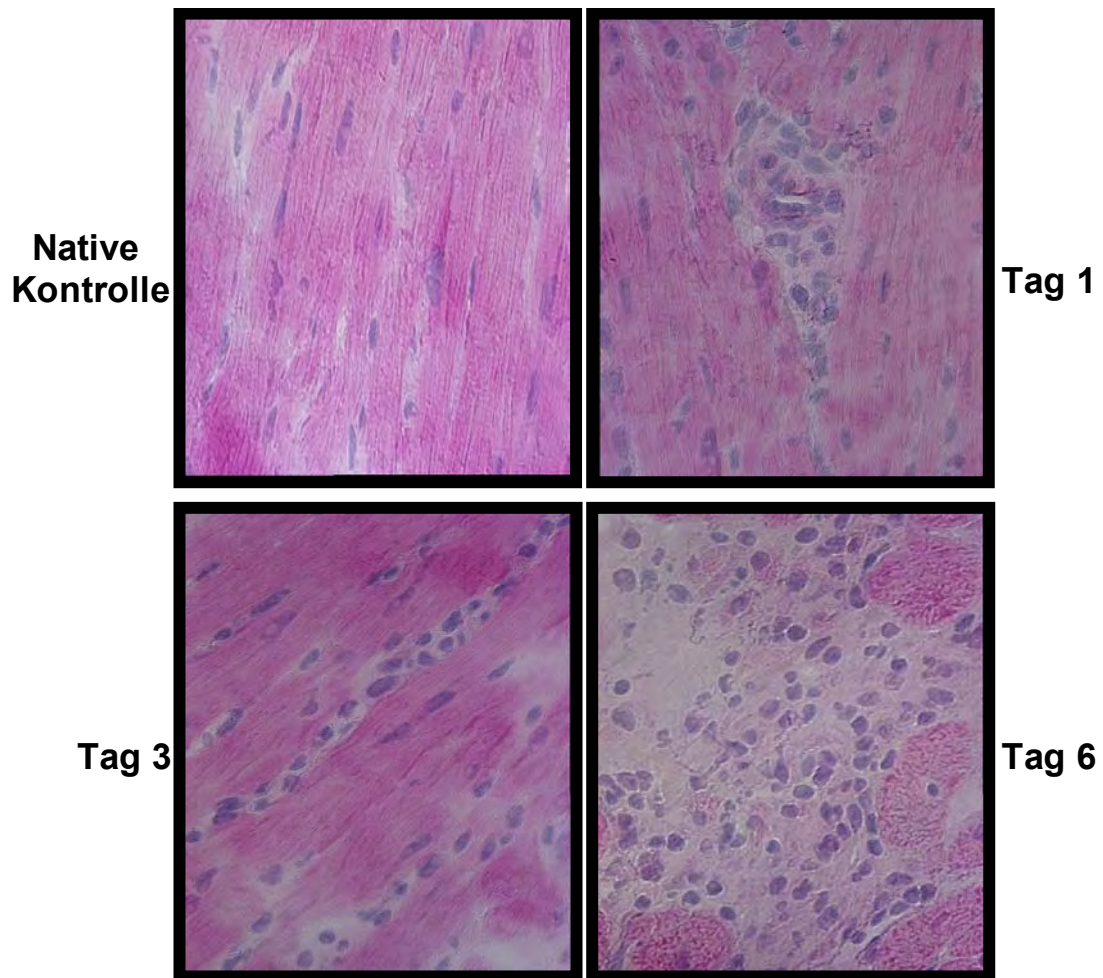


Abb. 13: Die zelluläre Infiltration bei unbehandelten Transplantaten im Zeitverlauf der akuten Abstoßung (Färbung H&E / 400-fach vergrößert): Bei unbehandelten Kontrollherzen konnte man am ersten Tag post Transplantationem eine leichte Perivaskulitis sehen. Schon am dritten Tag sah man deutlich eine Anreicherung von Zellen im Myokard, die bis zum Tag 6 weiter zunahm. An diesem Tag waren die Gewebeveränderungen des in der endgültigen Abstoßung befindlichen Organs in weiten Arealen zu erkennen.

3.1.2 Immunhistochemie

Die immunhistologische Charakterisierung der zellulären Infiltration ergab im Zeitverlauf der Abstoßung eine starke Infiltration mit immunkompetenten, MHC-II positiven Zellen. Im Speziellen erhöht sich die Anzahl der α/β -T-Zellrezeptor positiven T-Zellen und der ED-1 positiven Zellen (Monozyten/Makrophagen). Die Zahl der Zellen, die die induzierbare Form der NO Synthetase exprimieren, stieg im Zeitverlauf der akuten Abstoßung an.

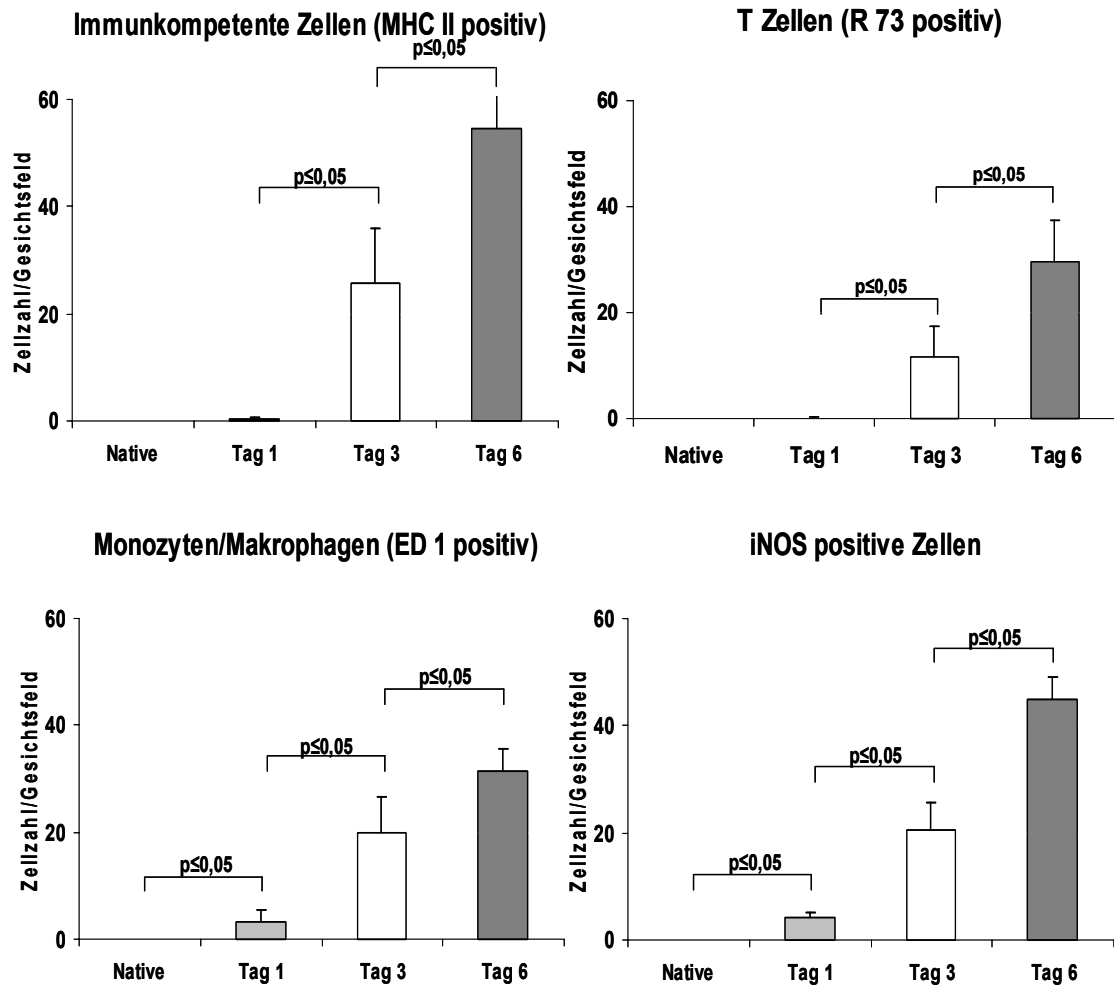


Abb. 14: Charakterisierung der zellulären Infiltration der unbehandelten Transplantate: Im Zeitverlauf der akuten Transplantatabstoßung (Tag 1-6 post OP) kam es im Verlgleich zu nicht transplantierten Herzen (Native) zur Infiltration des Transplantates. Dies ließ sich nachweisen anhand der MHC II positiven immunkompetenten Zellen (A) und spezifisch für T-Zellen (R73 positiv; B) und Monozyten/Makrophagen (ED1 positiv; C). Auch die Anzahl an iNOS produzierenden Zellen stieg im Zeitverlauf deutlich an (D). Darstellung der Mittelwerte ($n=4/\text{Tag}/\text{Gruppe}$ (Statistik: Wilcoxon-U-Test)).

3.1.3 Molekularbiologische Untersuchungen

Zur Bestimmung des relativen Expressionsgrades des Zielgens auf transkriptioneller Ebene wurde die Technik der semiquantitativen RT-PCR verwandt. Hier zeigte sich, dass die Konzentration der mRNA einer Reihe zentraler Moleküle der akuten Transplantatabstoßung mit der postoperativen Zeit signifikant anstieg. Die Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1, deren mRNA bei nicht transplantierten Kontrollherzen nicht nachzuweisen war, stieg unter der Transplantat-abstoßung an.

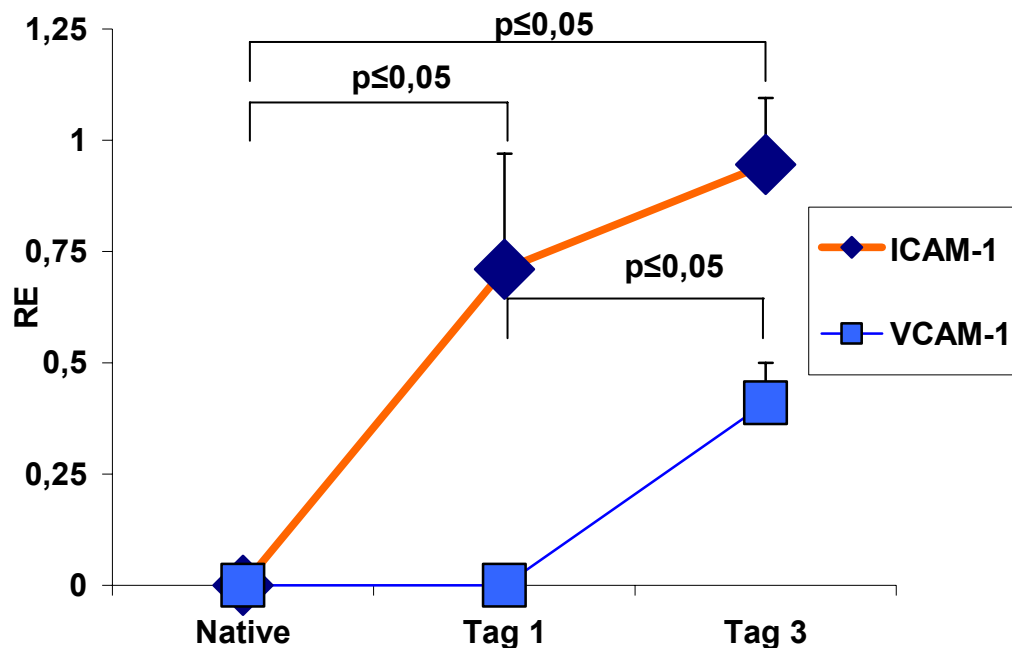


Abb. 15: Die relative mRNA Konzentrationen der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 im Gesamtlysate der Transplantate im Zeitverlauf der akuten Abstoßung: Sowohl die mRNA Konzentration des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 als auch von VCAM-1 stieg nach der Transplantation im Vergleich zu nicht transplantierten Kontrollen (Native) deutlich an. Dies konnte im semi-quantitativen Vergleich zur Konzentration des Standardgens PBGD als sog. Relative Einheiten (RE) erfasst werden. Darstellung der Mittelwerte der Relativen Einheiten \pm Standardabweichung ($n=4/\text{Tag}/\text{Gruppe}/$) (Wilcoxon-U-Test).

Darüber hinaus kam es zur Synthese der mRNA von IL-2, einem der wichtigsten Cytokine in der T-Zell-vermittelten Immunreaktion, die nur bei den transplantierten Herzen nachzuweisen waren. Die mRNA des Chemokines MCP-1 war auch in den Kontrollherzen vorhanden, stieg aber im Zeitverlauf der Abstoßung deutlich an.

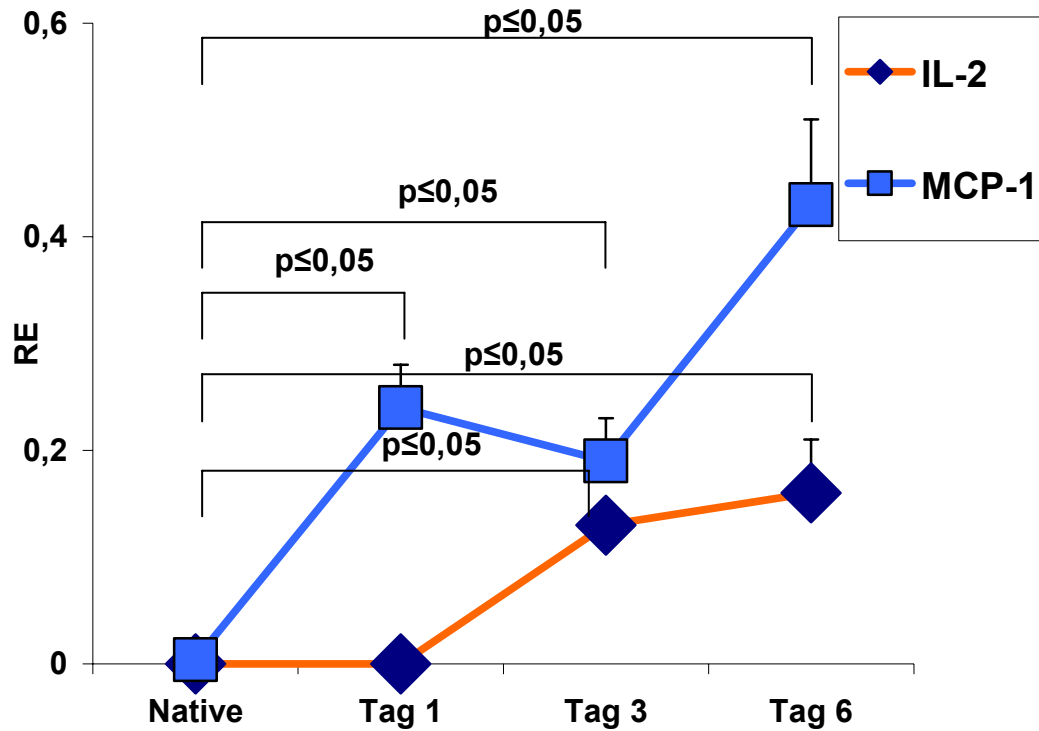


Abb. 16: Die relative mRNA Konzentrationen von IL-2 und MCP-1 im Gesamtlisat der Transplantate im Zeitverlauf der akuten Abstoßung: Sowohl die mRNA von IL-2 als auch des Chemokins MCP-1 stieg nach der Transplantation im Vergleich zu nicht transplantierten Kontrollen (Native) deutlich an. Dies konnte im semi-quantitativen Vergleich zur Konzentration des Standardgens PBGD als sog. Relative Einheiten erfasst werden. Darstellung der Mittelwerte der Relativen Einheiten (RE)±Standardabweichung (n=4/Tag/Gruppe/)(Wilcoxon-U-Test).

3.2 Modulation der akuten Transplantatabstoßung mit der immunmodulatorischen Substanz c3Ado

3.2.1 Versuchstiere

Die Herzen von Wistar-Furth-Ratten wurden heterotop in Lewis-Ratten transplantiert. Einer unbehandelten, akut abstoßenden Gruppe wurden die mit dem Immunmodulator c3Ado behandelten Tiere gegenübergestellt. Zum Vergleich der beiden Gruppen war es von Bedeutung, die Operation und insbesondere die Ischämiezeit des Transplantates weitestgehend zu standardisieren. In dieser Studie kam es zu keinem signifikanten Unterschied in der mittleren Ischämiezeit ($24,7\text{min.} \pm 2,1$ vs. $24,3\text{min.} \pm 2,6$, $p = \text{n.s.}$ (Mittelwert \pm Standardabweichung)).

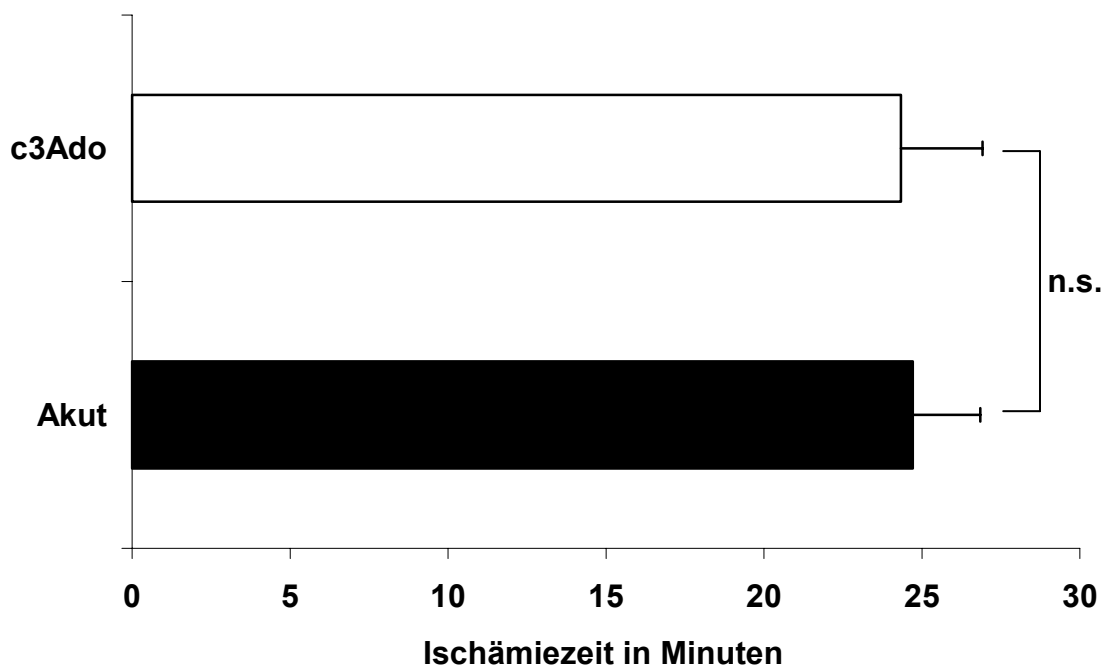


Abb. 17: Die mittlere Ischämiezeit der in die Studie aufgenommenen Transplantationen (c3Ado): Es kam zu keinem signifikanten Unterschied in der Ischämiezeit zwischen den beiden Gruppen (Mittelwert \pm Standardabweichung, $n=12/\text{Gruppe}$; Wilcoxon-U-Test).

Die Gewichte sowohl der Spender-, als auch der Empfängertiere unterschieden sich in den beiden Gruppen nicht signifikant ($199,6 \pm 17,1\text{g}$ vs. $190 \pm 23,5\text{g}$, $p = \text{n.s.}$, bzw. $314,2 \pm 11,0$ vs. $339,6 \pm 15,9$, $p = \text{n.s.}$ (Mittelwert \pm Standardabweichung)).

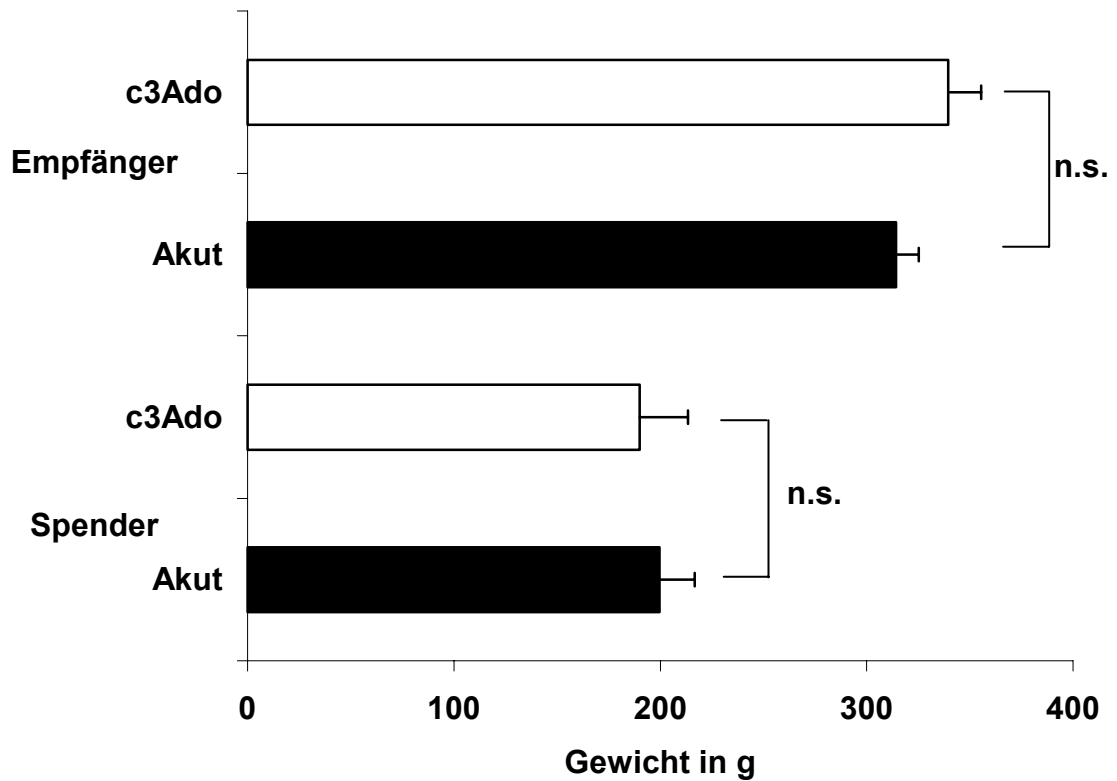


Abb. 18: Mittlere Gewichte der Spender- und Empfängertiere in der ersten Versuchsreihe (c3Ado): Sowohl bei den Spender-, als auch bei den Empfängertieren kam es zu keinem signifikanten Unterschied der mittleren Gewichte in beiden Gruppen (Mittelwerte \pm Standardabweichung, $n=15/\text{Gruppe}$; Wilcoxon-U-Test).

3.2.2 Transplantatüberleben

Ohne immunmodulatorische Therapie schlugen die Transplantate kurz nach der Reperfusion bis zum ca. 3. Tag kräftig und gleichmäßig. Dann kam es zum raschen Verlust der palpierbaren Schlagkraft. Nach $5,7 \pm 0,5$ Tagen kam es zum Sistieren der Transplantatfunktion und das Transplantat war zu diesem Zeitpunkt als vergrößertes, verhärtetes Organ im Bauchraum des Empfängers zu ertasten, ohne dass Kontraktionen palpabel waren.

Durch die 2mal tägliche Gabe von 5mg/kg/KGW des Immunmodulators c3Ado konnte kein signifikanter Unterschied im Transplantatüberleben festgestellt werden ($5,7 \pm 0,5$ vs. $5,3 \pm 0,5$, $p = \text{n.s.}$ (Mittelwert \pm Standardabweichung)).

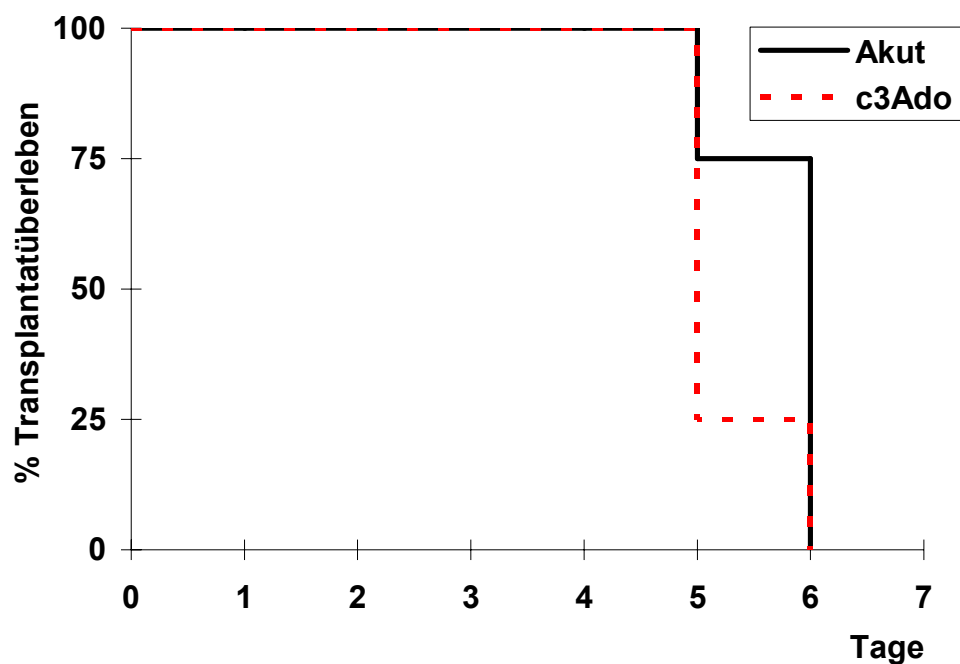


Abb. 19: Das Transplantatüberleben der c3Ado Gruppe im Vergleich zu unbehandelten Tieren in Prozent: Durch die Gabe des Immunmodulators c3Ado konnte das Transplantatüberleben nicht verlängert werden. Dargestellt sind die absoluten Zahlen der schlagenden Transplantate in Prozent zu der Gesamtzahl der Tiere ($n=4$).

3.2.3 Immunhistochemie

3.2.3.1 Adhäsionsmoleküle

3.2.3.1.1 *Icam-1*

In der Frühphase der Transplantatabstoßung spielen Adhäsionsmoleküle eine wichtige Rolle, da sie die Diapedese immunkompetenter Abwehrzellen des Empfängers in das Transplantat und damit eine Grundvoraussetzung für die Abstoßung des Transplantates ermöglichen.

Die Analysen ergaben, dass es bei den transplantierten Herzen sowohl am Tag 1 als auch am Tag 3 zu einer starken Erhöhung der Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 kam. Diese Hochregulation in der Frühphase der Transplantatabstoßung konnte durch die Gabe von c3Ado an beiden Tagen fast vollständig unterdrückt werden. So konnten am ersten Tag bei ca. 50 % der behandelten Tiere keine Anfärbung der postkapillären Venolen festgestellt werden. Im Gegensatz dazu verzeichneten die Tiere bei der akut abstoßenden Kontrollgruppe am Tag 1 mit ca. 75% der Tiere den Färbegrad 3, den stärksten Grad der ICAM-1 Expression. Am dritten Tag stellte sich die Situation ähnlich dar. Wieder war unter der c3Ado Behandlung die deutliche anteilige Verschiebung zum Färbegrad null, d.h. zu den auf ICAM-1 nicht angefärbten Gefäßen zu sehen. Die Gefäße der unbehandelten Tiere waren bis zu ca. 50 % mit dem Färbegrad 3 maximal ICAM-1 positiv.

3.2.3.1.2 *Vcam-1*

Ein fast identisches Bild zeigte sich bei dem immunhistologischen Nachweis der Expression des Adhäsionsmolekül VCAM-1 an den postkapillären Venolen. Hier konnte am Tag 1 und 3 durch die Gabe von c3Ado die Expression von VCAM-1 stark vermindert werden. Es kam bei dieser Anfärbung nur zu einer überwiegenden Einteilung mit dem Färbegrad 0 bis 2. Erneut blieben ca. die Hälfte der Gefäße in der c3Ado Gruppe ungefärbt, während die Zahl der Gefäße mit dem Färbegrad 0 in der akut abstoßenden Kontrollgruppe mit ca. 20% am ersten und ca. 10% am dritten Tag weit darunter lag.

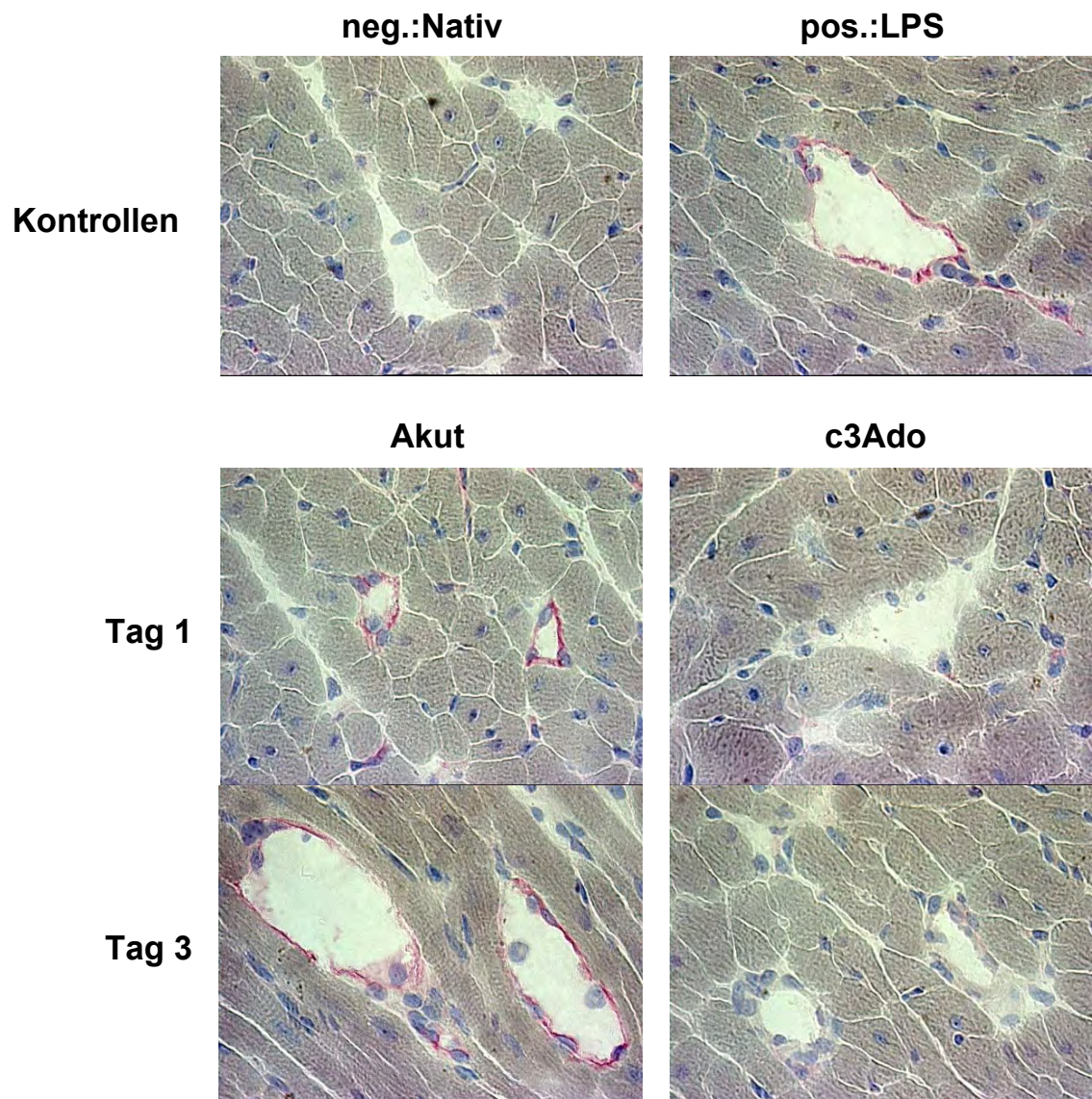


Abb. 20: Immunhistochemie ICAM-1 der c3Ado Tiere im Vergleich mit unbehandelten Tieren: Bei unbehandelten Tieren konnte ein deutlich höherer Färbegrad an den postkapillären Venolen nachgewiesen werden. Dies konnte durch die c3Ado Behandlung an dem Tag 1 und Tag 3 deutlich reduziert werden (400-fache Vergrößerung).

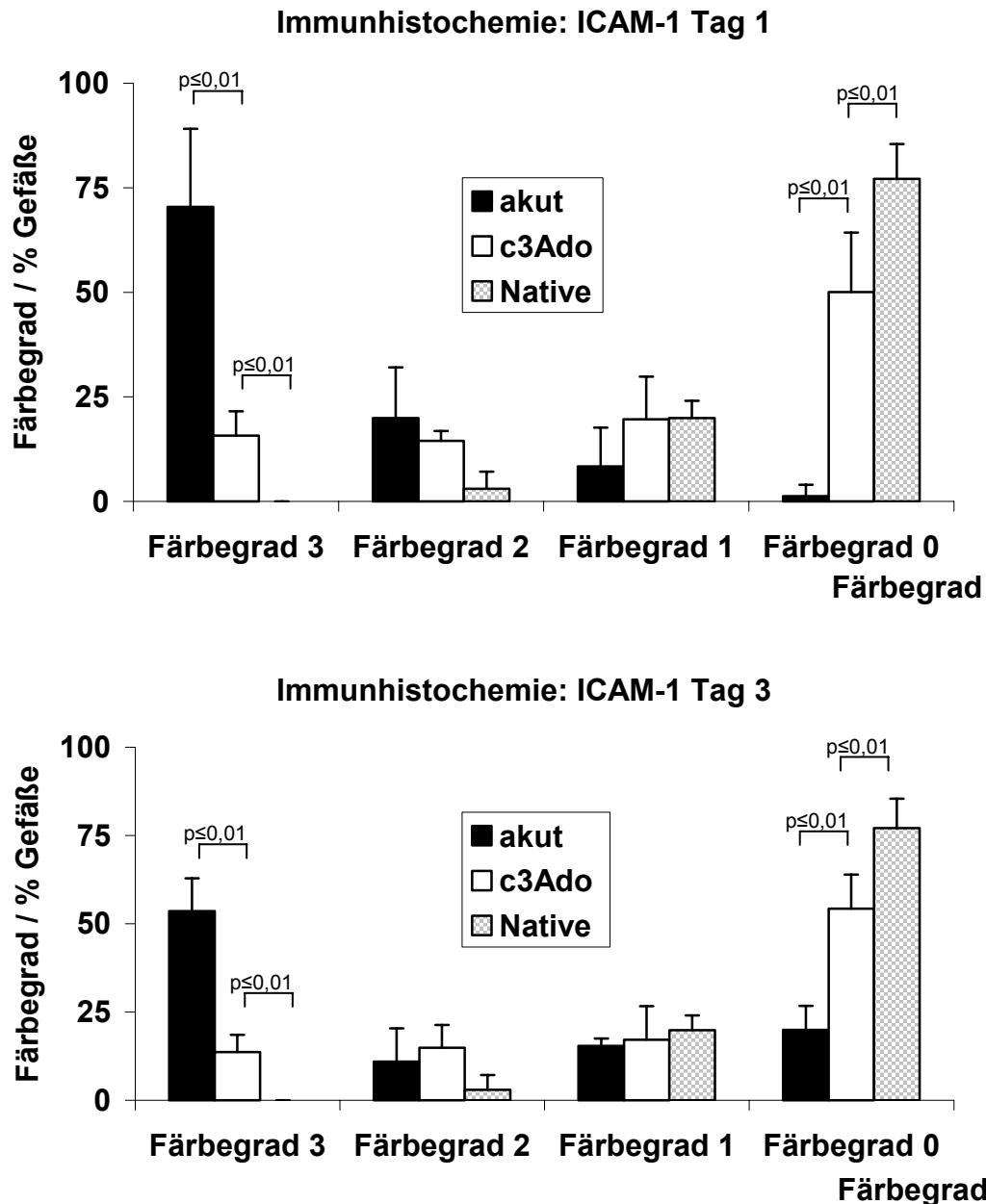


Abb. 21: Die verminderte Expression von ICAM-1 unter der c3Ado Behandlung am Tag 1 und Tag 3 post Transplantationem: Die Behandlung mit c3Ado verringerte signifikant die Expression (gemessen anhand der Einteilung in Färbegrade 0-3) des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 sowohl am Tag 1, als auch Tag 3. Dies wurde durch die Erfassung der immunhistochemischen Anfärbung in verschiedene Färbegrade (0-3) erfasst (Darstellung: Mittelwerte der prozentualen Verteilung (n=4/Tag/Gruppe) (Wilcoxon-U-Test)).

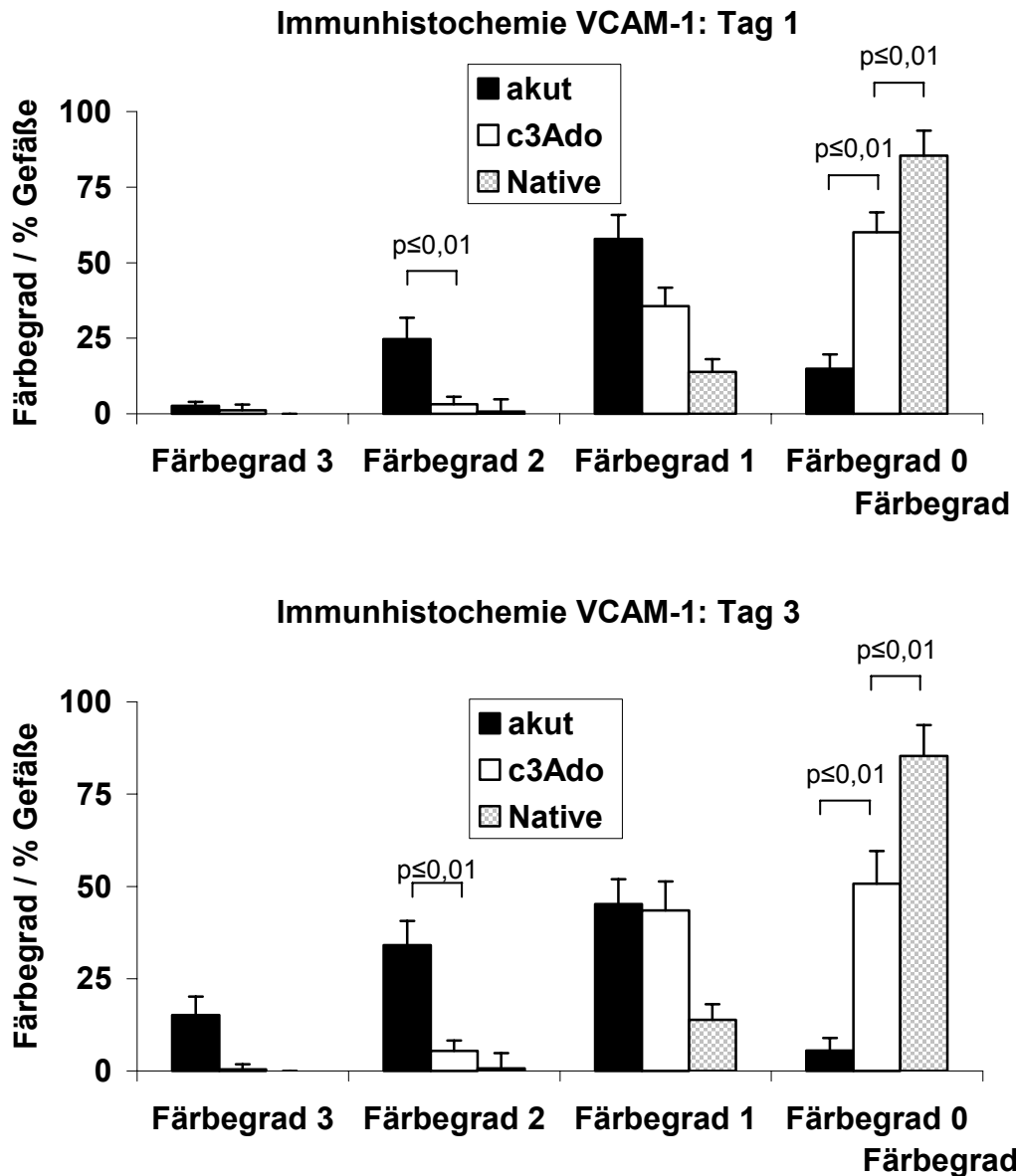


Abb. 22: Die verminderte Expression von VCAM-1 unter der c3Ado-Behandlung am Tag 1 und Tag 3 post transplantationem: Unter der c3Ado Behandlung verringerte sich die Expression des Adhäsionsmoleküls VCAM-1 im Vergleich zu den unbehandelten, akut abstoßenden Tieren sowohl am Tag 1 als auch 3 signifikant. Dies wurde durch die Erfassung der immunhistochemischen Anfärbung in verschiedene Färbegrade (0-3) erfasst (Darstellung: Mittelwerte der prozentualen Verteilung (n=4/Tag/Gruppe) (Wilcoxon-U-Test)).

3.2.3.2 Zelluläre Infiltration

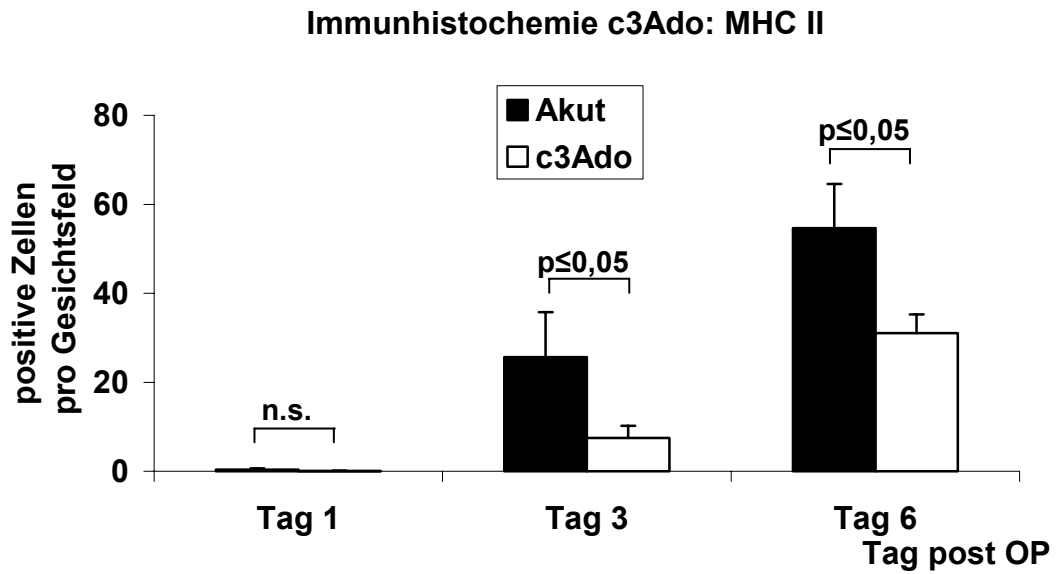
3.2.3.2.1 MHC II

Im Zeitverlauf der akuten Abstoßung kam es histologisch zu einer starken Infiltration mit mononukleären Zellen. Diese Zellen sind in der Lage, fremdes Gewebe zu erkennen und die Abstoßungsreaktion zu vermitteln. Mit Hilfe der Immunhistochemie erfolgte die qualitative und quantitative Charakterisierung der infiltrierenden Zellen. Zur Quantifizierung der immunkompetenten Zellen wurde die Zahl der MHC II positiven Zellen erfasst. Die MHC II-Komplexe werden überwiegend von spezialisierten Antigen-präsentierenden Zellen, wie den dendritischen Zellen, Makrophagen und B-Lymphozyten, aber auch von einigen wenigen anderen Zellen exprimiert. Der Exprimierungsgrad wird durch inflammatorische und immunologische Stimuli erhöht, wie z.B. durch Zytokine wie IFN- γ . Hier zeigte sich, dass es am ersten Tag schon zu einer geringen Zahl an infiltrierenden Zellen kommt. Am dritten Tag ist die Zahl um ein vielfaches angestiegen und steigt weiter bis zum Tag 6. Durch die Gabe von c3Ado konnte die Infiltration der Transplantate mit MHC-II positiven Zellen an den Tagen 3 und 6 *post transplantationem* signifikant vermindert werden.

3.2.3.2.2 Monozyten/Makrophagen und T-Zellen

Um die Art der Zellen weiter zu charakterisieren, wurden zum einen ein Antikörper gegen die Alpha- und Beta-Ketten-Anteile des T-Zellrezeptors (Klon R 73) und zum anderen ein Antikörper gegen ED-1, einen spezifischen Zellmarker für Monozyten und Makrophagen, eingesetzt. T-Zellen stehen im Zentrum der akuten Transplantat-abstoßung, aber auch die unspezifische zelluläre Abwehr, die hauptsächlich von Monozyten und Makrophagen vermittelt wird, führt zur Schädigung des Transplantates. Hier zeigte sich, dass sowohl bei T-Zellen als auch bei Monozyten/Makrophagen eine progredient zunehmende Infiltration der Transplantate im zeitlichen Verlauf der akuten Abstoßung zu erfassen war. Bei den mit c3Ado behandelten Tieren konnte für die im Zentrum der Abstoßung stehenden T-Zellen eine Reduktion sowohl am Tag 3, als auch Tag 6 *post transplantationem* festgestellt werden. Durch die Gabe von c3Ado konnte zusätzlich auch die Anzahl an infiltrierenden Monozyten/Makrophagen am Tag 3 und 6 im Vergleich zu den akut abstoßenden unbehandelten Tieren signifikant reduziert werden.

A



B

MHC II	Native	Tag 1	Tag 3	Tag 6	
	0.0 ± 0.0	0.4 ± 0.9 0.1 ± 0.2	25.6 ± 24.6 7.5 ± 9.5	54.6 ± 16.0 31.0 ± 13.0	Akut c3Ado

Abb. 23: Immunhistochemie c3Ado MHC II positive Zellen: C3Ado vermindert die Infiltration mit MHC II positiven Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Kontrolltieren (Akut). An den Tagen 3 und 6 nach der Transplantation konnte die Anzahl an MHC II positiven, immunkompetenten Zellen signifikant reduziert werden ($n=4/\text{Tag}/\text{Gruppe}$). Darstellung der Mittelwerte und der Standardabweichung als Grafik(A) und Tabelle (B) (Wilcoxon-U-Test).

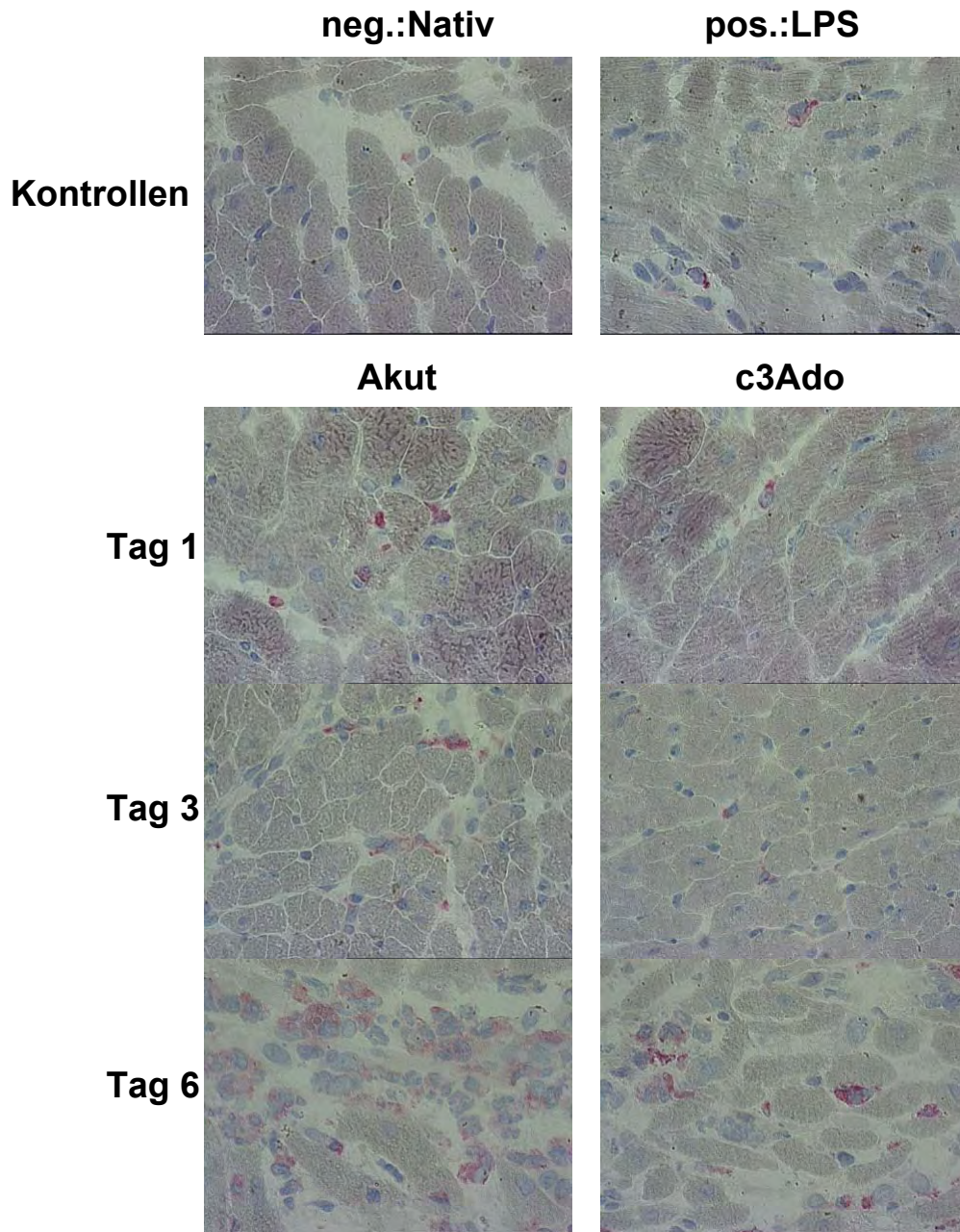


Abb. 24: Immunhistochemie c3Ado ED 1 positive Zellen (Monozyten/Makrophagen): C3Ado reduziert die Infiltration mit ED 1 positiven Monozyten/Makrophagen an den Tagen 3 und 6 nach der Transplantation im Vergleich mit den akut abstoßenden Kontrolltieren (400-fache Vergrößerung).

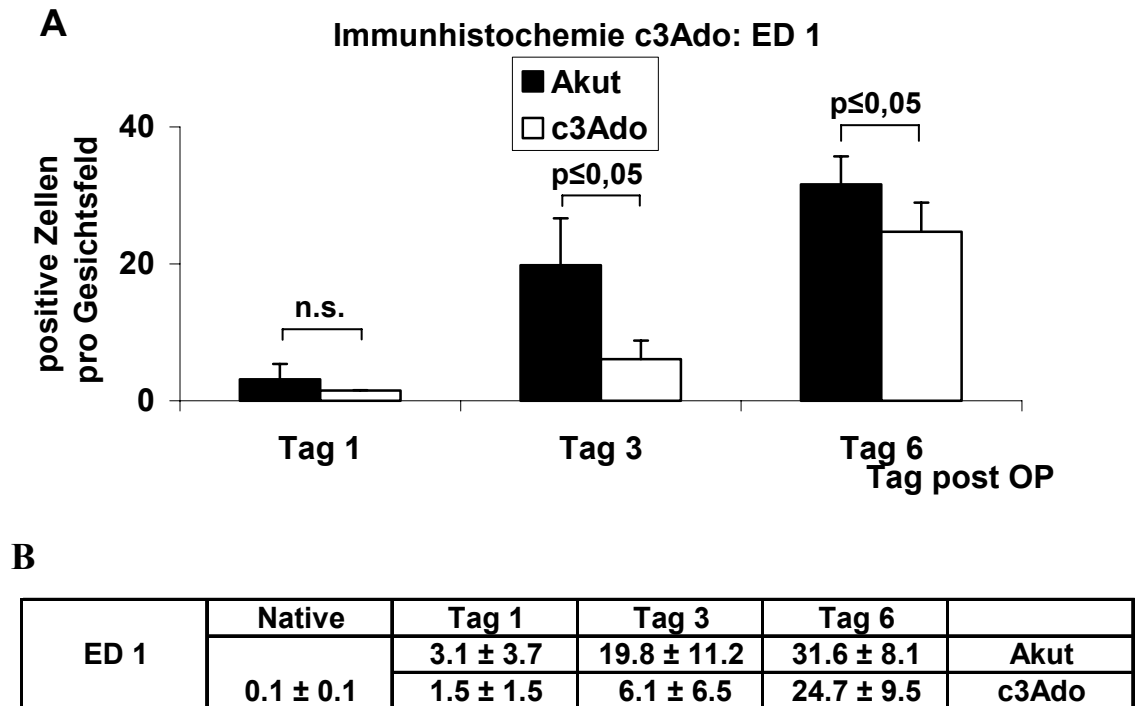


Abb. 25: Immunhistochemie c3Ado ED-1 positive Zellen (Monozyten/Makrophagen): Durch die Gabe von c3Ado konnte ganz spezifisch die Anzahl an Monozyten/Makrophagen (ED-1 positiv) an den Tagen 3 und 6 signifikant reduziert werden ($n=4/\text{Tag}/\text{Gruppe}$) im Vergleich zu den unbehandelten Kontrolltieren (Akut). Darstellung der Mittelwerte und der Standardabweichung als Grafik(A) und Tabelle (B) (Wilcoxon-U-Test).

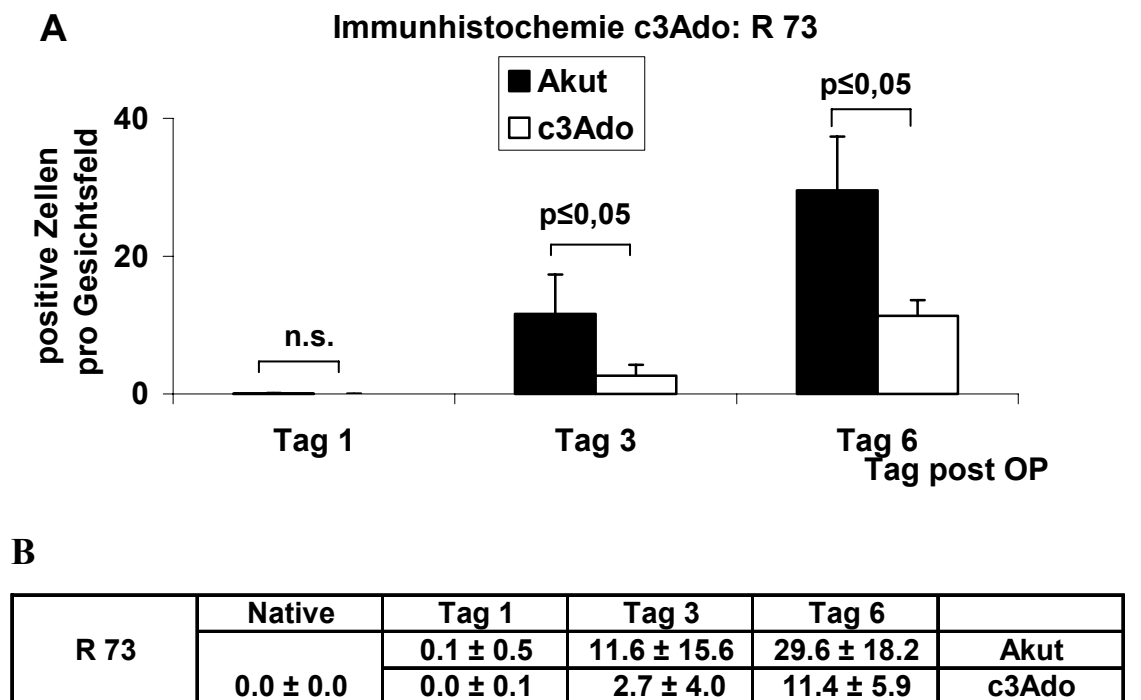
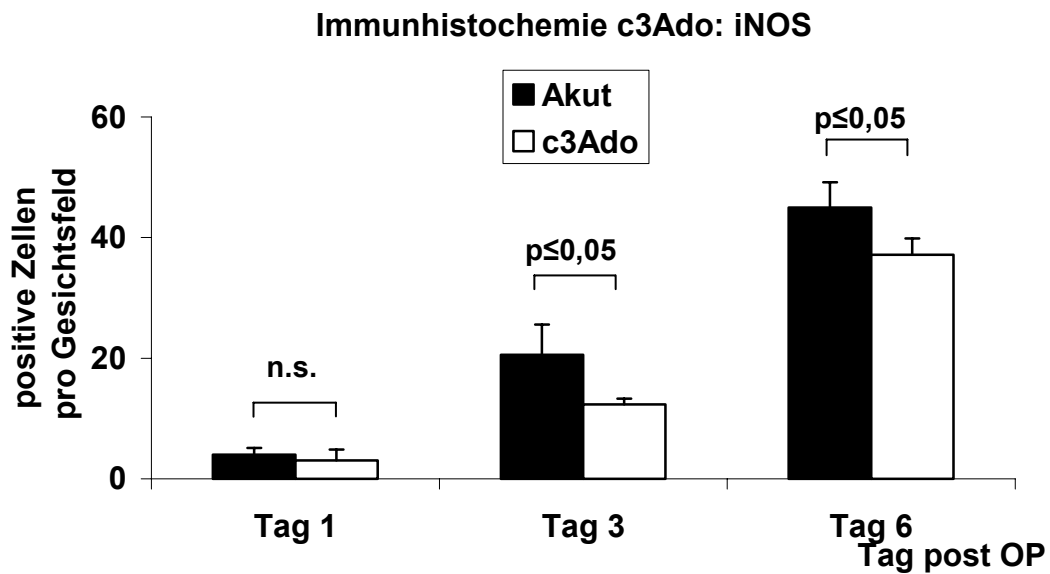


Abb. 26: Immunhistochemie c3Ado R73 positive Zellen (T-Zellen): Durch die Gabe von c3Ado konnte ganz spezifisch die Anzahl an T-Zellen (R73 positiv) an den Tagen 3 und 6 signifikant reduziert werden ($n=4/\text{Tag}/\text{Gruppe}$) im Vergleich zu den unbehandelten Kontrolltieren (Akut). Darstellung der Mittelwerte und der Standardabweichung als Grafik(A) und Tabelle (B) (Wilcoxon-U-Test).

3.2.3.2.3 iNOS

Um die potentielle Synthese des direkt zytotoxisch wirkenden Mediators NO zu erfassen, wurden die iNOS positiven Zellen angefärbt. Hier zeigte sich bei den unbehandelten Tieren eine starke Erhöhung der Zellen im Vergleich mit den nicht transplantierten Organen. Auch diese Zellen konnten durch die Gabe des c3Ado an den Tagen 3 und 6 reduziert werden.

A



B

iNOS	Native	Tag 1	Tag 3	Tag 6	
	0.1 ± 0.1	4.0 ± 2.8	20.6 ± 13.0	45.0 ± 8.4	Akut
		3.0 ± 2.8	12.3 ± 8.7	37.2 ± 7.1	c3Ado

Abb. 27: Immunhistochemie c3Ado iNOS positive Zellen: Die Anzahl der iNOS positiven, NO produzierenden Zellen erniedrigte sich sowohl am Tag 3 als auch Tag 6 post Transplantationem durch die Behandlung der Tiere mit c3Ado ($n=4/\text{Tag}/\text{Gruppe}$) im Vergleich zu den unbehandelten Kontrolltieren (Akut). Darstellung der Mittelwerte und der Standardabweichung als Grafik(A) und Tabelle (B)(Wilcoxon-U-Test).

3.2.4 Molekularbiologische Untersuchungen

3.2.4.1 RT-PCR

3.2.4.1.1 Adhäsionsmoleküle

Parallel zu den immunhistologischen Analysen wurde durch molekularbiologische Untersuchungen die relative zelluläre Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 auf transkriptioneller Ebene untersucht. Hier zeigte sich ein Anstieg in der Produktion der mRNA, die allerdings im Vergleich mit den histologischen Befunden später einsetzt. So kam es bei den Transplantaten ab dem ersten Tag zu einem Anstieg der mRNA-Produktion von ICAM-1, die sich am 3. Tag noch massiv steigerte. Bei VCAM-1 konnte man erst am 3. Tag eine mRNA-Produktion erfassen. Durch die Gabe von c3Ado konnte bei beiden Adhäsionsmolekülen keine signifikante Veränderung in der mRNA-Produktion festgestellt werden.

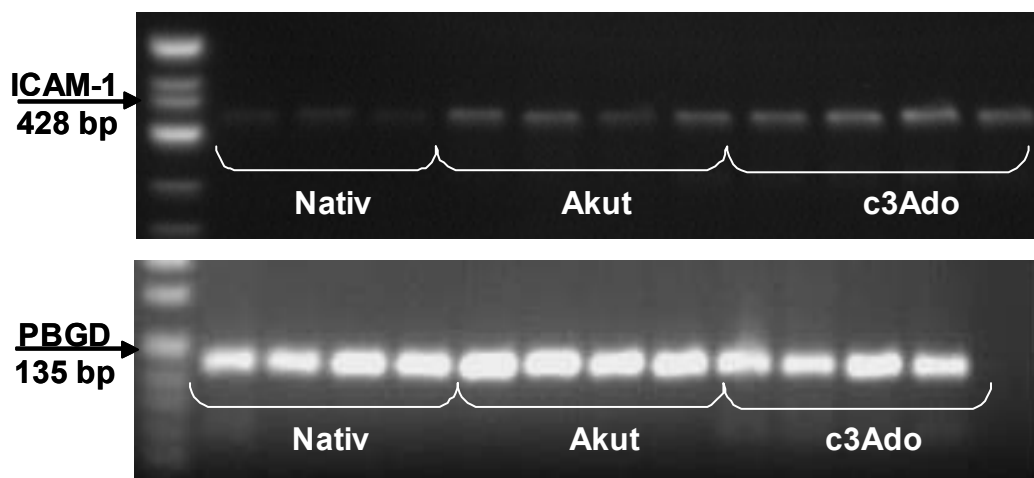


Abb. 28 Die Konzentration der mRNA von ICAM-1 und VCAM-1 im Gesamtlysate der Transplantate im direkten Vergleich (Beispiel ICAM-1 Tag1): Die relative Konzentration (anhand des Standardgens PBGD abgeglichen) der mRNA von ICAM-1 und VCAM-1 in der c3Ado-Gruppe unterscheidet sich nicht signifikant ($n=4/\text{Tag}/\text{Gruppe}$) im Vergleich zu den unbehandelten Kontrolltieren (Akut) (Wilcoxon-U-Test).

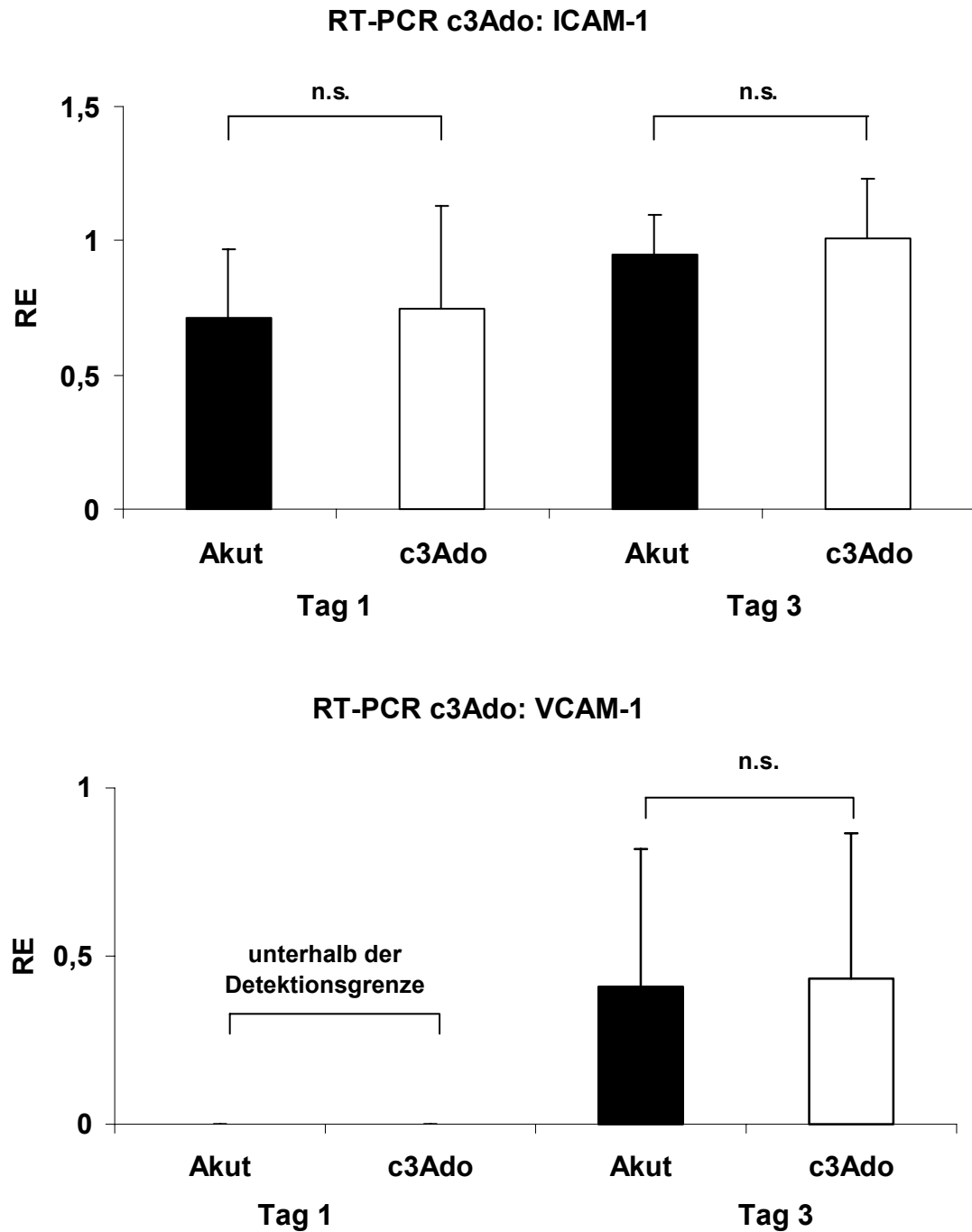


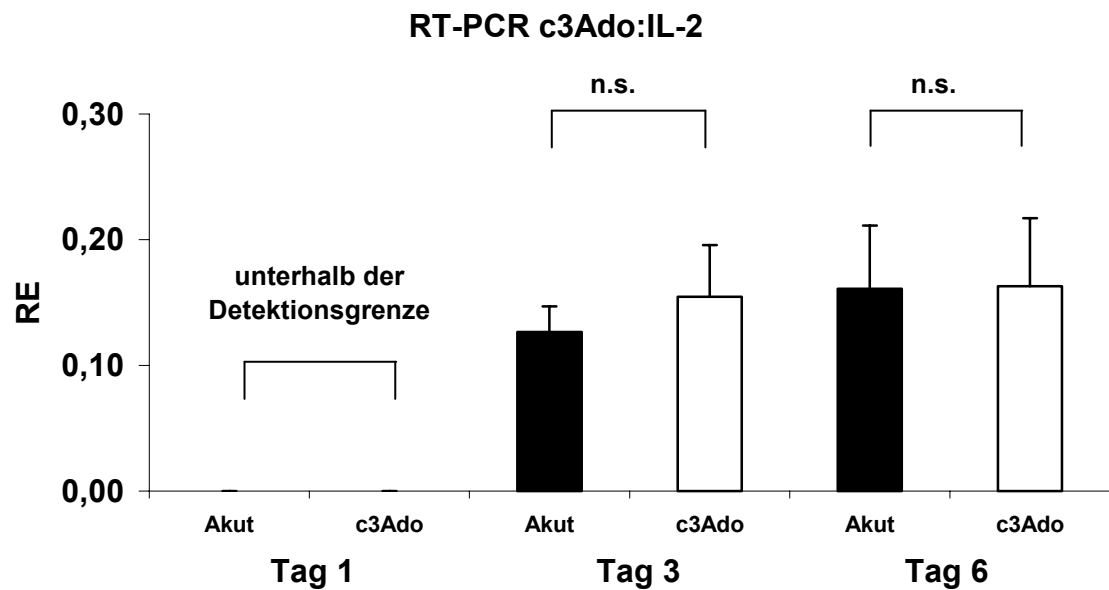
Abb. 29: Die Konzentration der mRNA von ICAM-1 und VCAM-1 im Gesamtlisat der Transplantate: Auf molekularer Ebene kam es zu keiner signifikanten Verminderung der Konzentration der mRNA im Gesamtlisat von ICAM-1 und VCAM-1 unter der c3Ado Behandlung ($n=4/\text{Tag}/\text{Gruppe}$) im Vergleich zu den unbehandelten Kontrolltieren (Akut). Darstellung der Mittelwerte der Relativen Einheiten (RE) und der Standardabweichung (Wilcoxon-U-Test).

3.2.4.1.2 Cytokine und Chemokine

Um die Konzentration zweier Vermittler der zellulären Immunantwort in den Transplantaten zu erfassen, wurde die relative Expression des Cytokines IL-2 und des Chemokines MCP-1 bestimmt. Hier zeigte es sich, dass IL-2, welches in den nicht transplantierten Kontrollherzen nicht nachzuweisen war, bei den Transplantaten anstieg. Durch die c3Ado Gabe konnte die relative Expression nicht nachweisbar verändert werden.

Einer der wichtigsten chemoattraktiven Botenstoffe für Monozyten ist das Monocyte chemoattractant protein (MCP)-1. Bei diesem Chemokin war auch bei den Kontrolltieren ein geringer mRNA-Spiegel nachzuweisen. Dieser steigt unter der Transplantation an. Auch für diesen Botenstoff konnte keine signifikante Veränderung in der mRNA-Konzentration im Gesamtgewebe der behandelten Organe festgestellt werden.

A



B

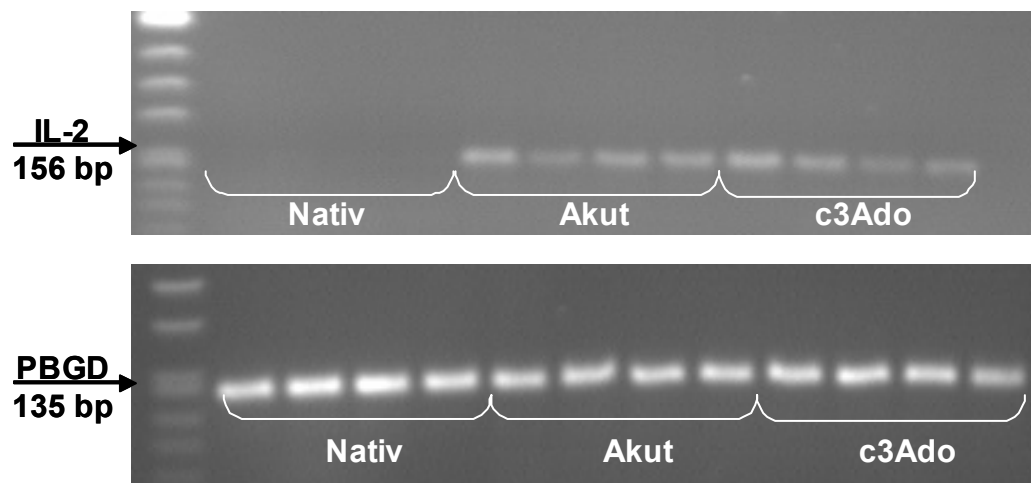
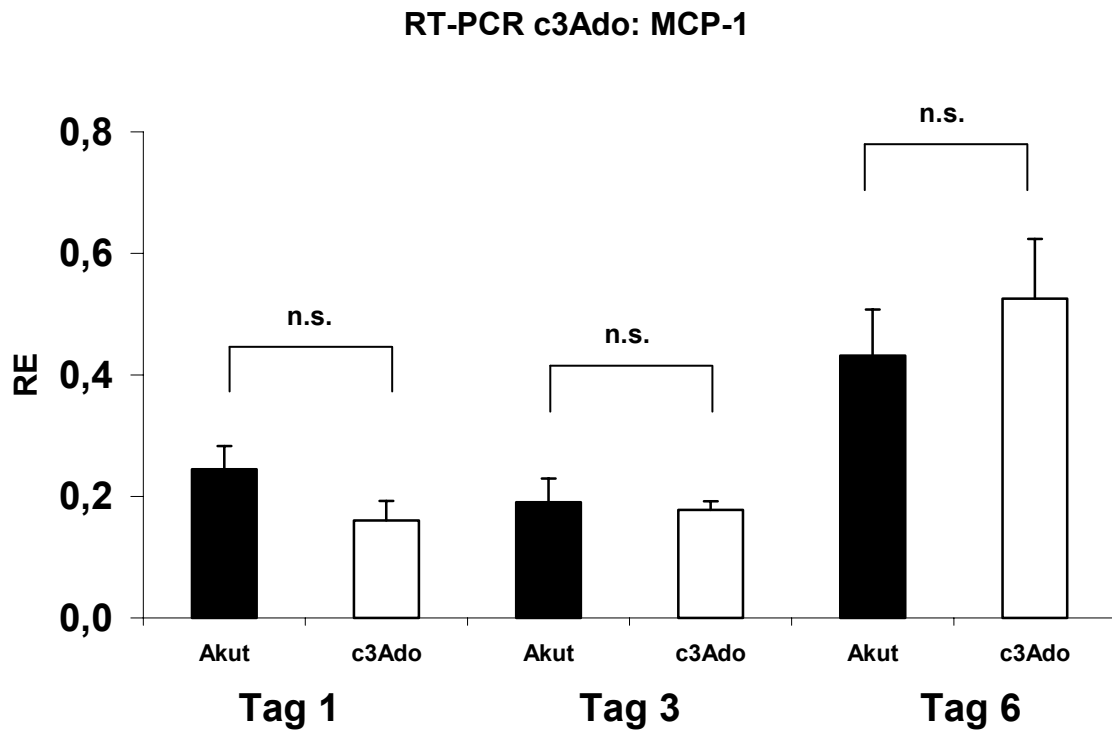


Abb. 30: Die Konzentration der mRNA von IL-2 im Vergleich der c3Ado-Gruppe mit unbehandelten Tieren: Die am dritten und sechsten Tag auf transkriptioneller Ebene in den transplantierten Herzen im Gegensatz zu den nicht transplantierten Kontrollherzen (Native) erfassbare mRNA des IL-2 konnte durch c3Ado nicht reduziert werden ($n=4/\text{Tag}/\text{Gruppe}$) (Wilcoxon-U-Test). **A:** Darstellung der Mittelwerte der Relativen Einheiten (RE) und der Standardabweichung. **B:** Beispiel eines Agarose Gels: IL-2, Tag 3 und des Housekeeping Gens PBGD.

A



B

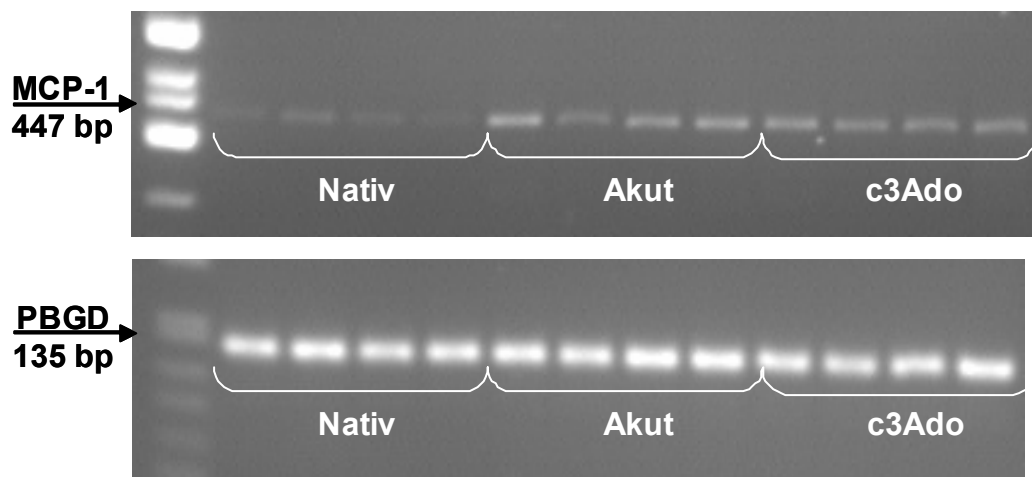


Abb. 31: Die Konzentration der mRNA von MCP-1 im Vergleich der c3Ado-Gruppe mit unbehandelten Tieren: Die unter der Abstoßung im Vergleich zu nicht transplantierten Herzen erhöhte Konzentration der mRNA des Chemokins MCP-1 konnte durch die Gabe von c3Ado nicht beeinflusst werden (n=4/Tag/Gruppe). (Wilcoxon-U-Test) **A:** Darstellung der Mittelwerte der Relativen Einheiten (RE) und der Standardabweichung. **B:** Beispiel eines Agarose Gels: MCP-1, Tag 3 und des Housekeeping Gens PBGD.

3.2.5 Nachweis der Apoptose

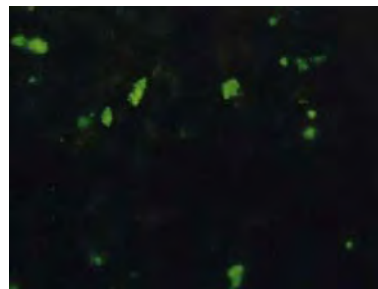
3.2.5.1 TUNEL-Reaktion

Die Induktion der Apoptose ist ein Effektormechanismus der akuten Transplantat-abstoßung. Als ein Nachweis des programmierten Zelltodes und zur quantitativen Erfassung der gesteigerten Apoptoserate kann man auf Gewebeschnitten mit der so genannten TUNEL-Reaktion die apoptotischen Zellen markieren. Dies ließ sich durch eine Fluoreszenzmarkierung nachweisen. Hier bestätigte sich die erhöhte Apoptoserate der Kardiomyozyten bei den transplantierten Organen. Durch die Gabe von c3Ado konnte diese Erhöhung am Tag 6, dem Tag des Organversagens, nicht verhindert werden.

**Native
Kontrolle**



Akut



c3Ado

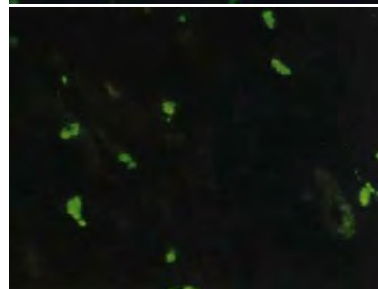


Abb. 32: Nachweis der gesteigerten Apoptoserate bei Transplantaten durch die TUNEL-Reaktion: In den Transplantaten konnte am Tag 6 post Transplantationem eine gesteigerte Apoptoserate nachgewiesen werden. Dabei kam es zu keinem signifikanten Unterschied zwischen den akut abstoßenden Kontrolltieren (akut) und den c3Ado behandelten Tieren (400-fache Vergrößerung) (Wilcoxon-U-Test).

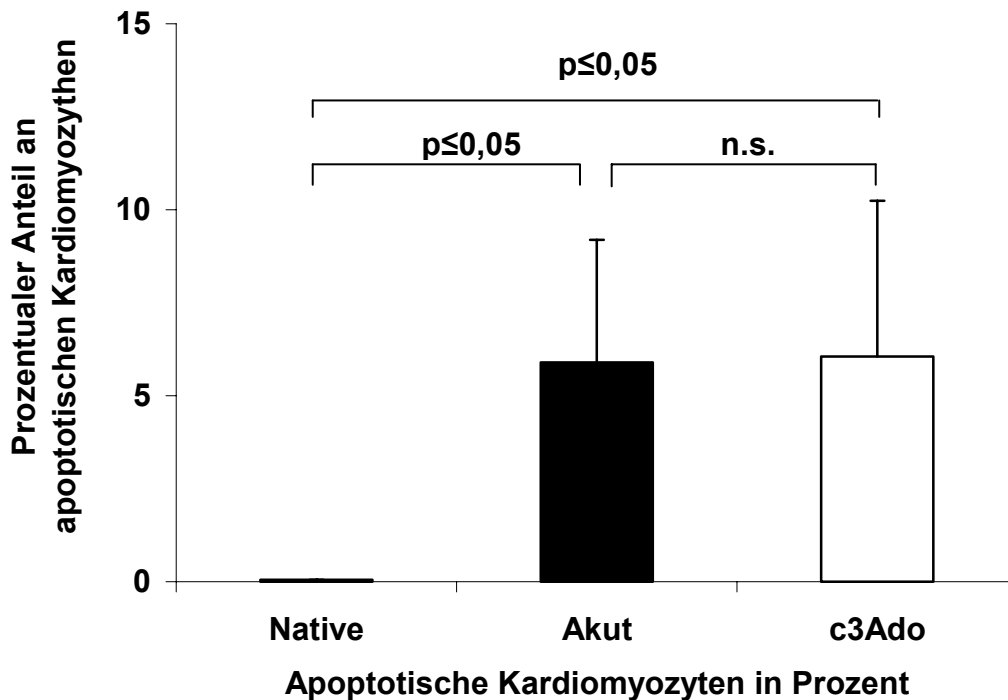


Abb. 33: Quantifizierung der Apoptoserate der Kardiomyozyten in den Transplantaten am Tag 6 post Transplantationem: Bei den transplantierten Herzen kommt es am Tag 6 post Transplantationem zu einer stark gesteigerten Apoptoserate der Kardiomyozyten im Vergleich zu den nicht transplantierten Kontrollherzen (Native). Zwischen den unbehandelten Tieren (akut) und der c3Ado Gruppe konnte kein Unterschied festgestellt werden ($n=4/\text{Tag}/\text{Gruppe}$). Darstellung der Mittelwerte und der Standardabweichung (Wilcoxon-U-Test).

3.2.5.2 DNA-Laddering

Um auf molekularer Ebene eine gesteigerte Apoptoserate in einem Gewebe nachzuweisen, kann man die für den programmierten Zelltod typische Fragmentierung der DNA sichtbar machen. Diese zeigt sich durch die Bandenbildung der Fragmente, die immer ein Vielfaches der Histion-Größe darstellen und damit eine so genannte Leiter bilden. Hier zeigte sich, dass es am 6. Tag nach Transplantation im Vergleich zu den Kontrollherzen bei den Transplantaten zur typischen Leiterbildung kommt. Auch bei den c3Ado behandelten Tieren war dies nachweisbar.

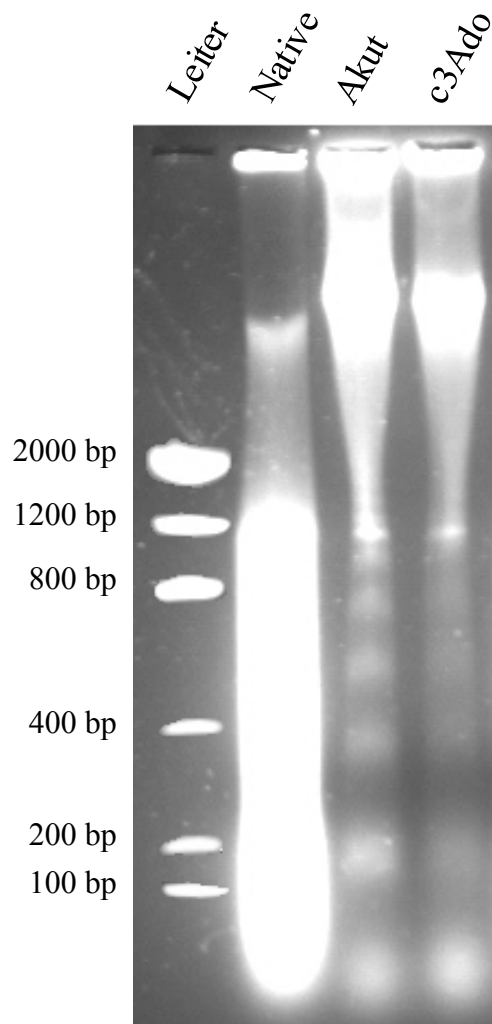


Abb. 34: Nachweis der Apoptose auf molekularer Ebene: Durch die Visualisierung der DNA kann man die für die Apoptose typische Fragmentierung darstellen. Man kann erkennen, dass es in beiden transplantierten Gruppen zu dieser DNA Fragmentierung gekommen ist im Vergleich zu den nicht transplantierten Kontrollherzen (Native) ($n=4/\text{Tag}/\text{Gruppe}/\text{Tag}/\text{Gruppe}$).

3.3 Modulation der akuten Transplantatabstoßung durch den Einsatz von *STAT-1* und *AP-1* ODN-Decoys

3.3.1 Versuchstiere

In der zweiten Studie wurde die Ischämiezeit auf 45 Minuten warme Ischämie genormt, um eine aktive Aufnahme der Decoys durch aktiven Zelltransport zu ermöglichen. Trotz dieser verlängerten Ischämiezeit kam es bei der nur mit Pufferlösung perfundierten Kontrollgruppe im Vergleich mit der akut abstoßenden Kontrollgruppe aus den ersten Versuchen zu keiner Verkürzung des Transplantatüberlebens ($5,7\text{Tage} \pm 0,5$ bzw. $5,6\text{Tage} \pm 0,5$ (Mittelwert \pm Standardabweichung; n.s., Wilcoxon-U-Test))

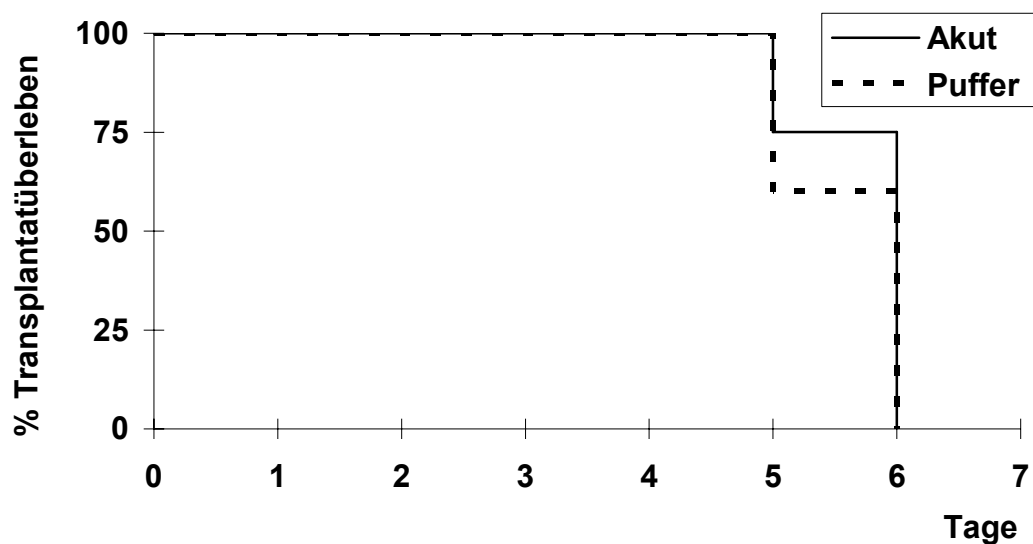
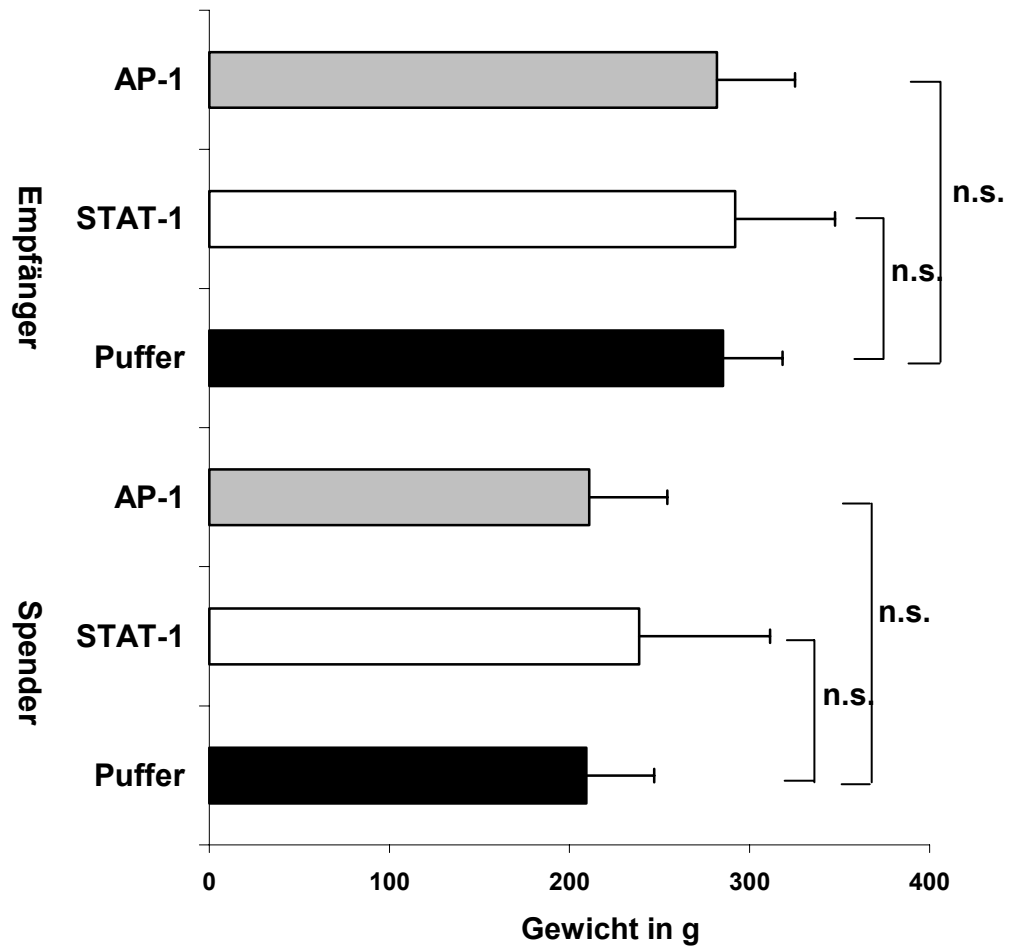


Abb. 35 Das Transplantatüberleben der unbehandelten Kontrollgruppen: Durch die verlängerte, auf 45 Minuten genormte Ischämiezeit bei den Kontrolltieren (Puffer) der zweiten Studie kommt es im Vergleich zu den Kontrolltieren aus der ersten Gruppe (akut) zu keiner Veränderung im Transplantatüberleben (Wilcoxon-U-Test).

Die Gewichte der zur Operation verwandten Tiere in der Versuchsreihe unterschieden sich nicht signifikant



Mittleres Gewicht				
	Puffer	STAT-1	AP-1	
Spendertiere	209,3g±37,8	238,7g±72,7	211,0g±43,5	p=n.s.
Empfängertiere	285,3g±33,1	292,0g±55,6	282,0g±43,4	p=n.s.

Abb. 36: Mittlere Gewichte der Tiere (ODN): Es kam zu keinem signifikanten Unterschied in den mittleren Gewichten der Spender-, oder Empfängertiere (n=5/Tag/Gruppe) zwischen den einzelnen Gruppen. Darstellung der Mittelwerte und der Standardabweichung (Wilcoxon-U-Test).

3.3.2 Transplantatüberleben

Als erstes wurde der Einfluss der ODN-Therapie auf das Transplantatüberleben untersucht. Hier zeigte sich, dass durch die Perfusion sowohl der STAT-1- als auch der AP-1-consensus-Decoys das Überleben der Transplantate sich um ca. 33% verlängerte (von Akut: 5.6 ± 0.5 Tage auf, STAT-1: 7.4 ± 0.5 , bzw. AP-1: 7.8 ± 1 (Mittelwert \pm Standardabweichung)).

Um zu verifizieren, dass dieser Effekt auf den spezifischen Einsatz dieser Decoys zurückzuführen ist, wurden die Überlebensdaten von den mit consensus Decoys behandelten Tiere, mit denen mit mutierten ODN-Strängen perfundierter Organe verglichen. Diese mutierten ODN-Stränge zeichnen sich durch eine Mutation in der Bindungs/Promotor-Region aus. Hierbei zeigte sich zum einen, dass das Transplantatüberleben der consensus-Gruppen signifikant verlängert war im Vergleich zu den mit mutierten Decoys behandelten Gruppen. Zum anderen zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den mit mutierten ODN-Strängen perfundierten und den mit dem Puffer perfundierten Tieren. Im Gegensatz zu den spezifischen Decoys veränderte sich durch die Perfusion mit mutierten ODN-Strängen das Transplantatüberleben nicht (n=5/Tag/Gruppe: Puffer: 5.6 ± 0.5 Tage, mutierte AP-1 dODN: 5.8 ± 0.8 Tage, mutierte STAT-1 dODN: 5.8 ± 0.4 Tage (Mittelwert \pm Standardabweichung)). Dadurch können unspezifische Reaktionen der eingesetzten Decoys in der Studie ausgeschlossen werden.

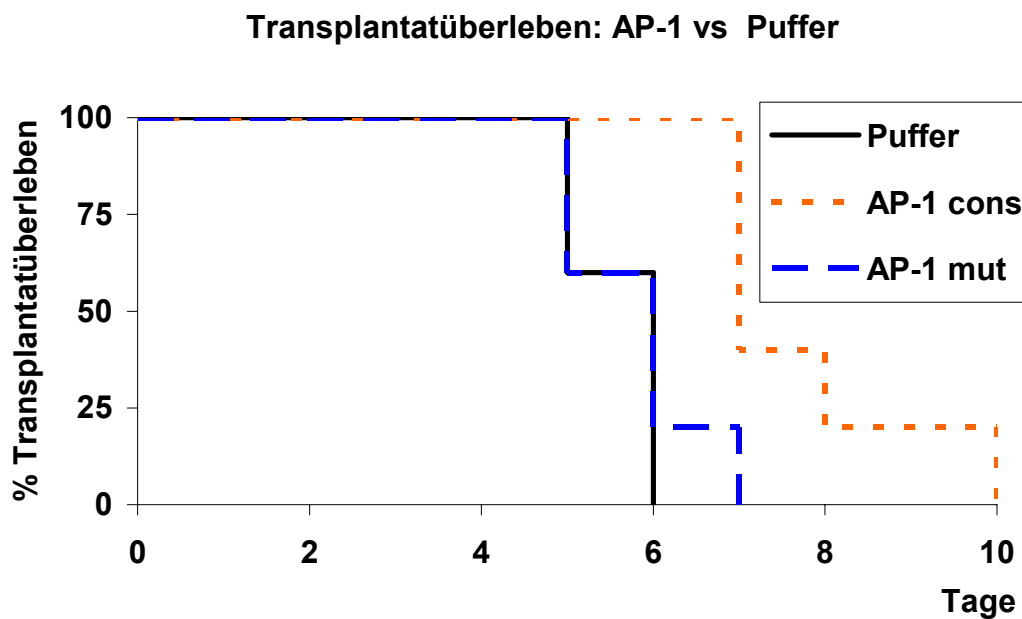
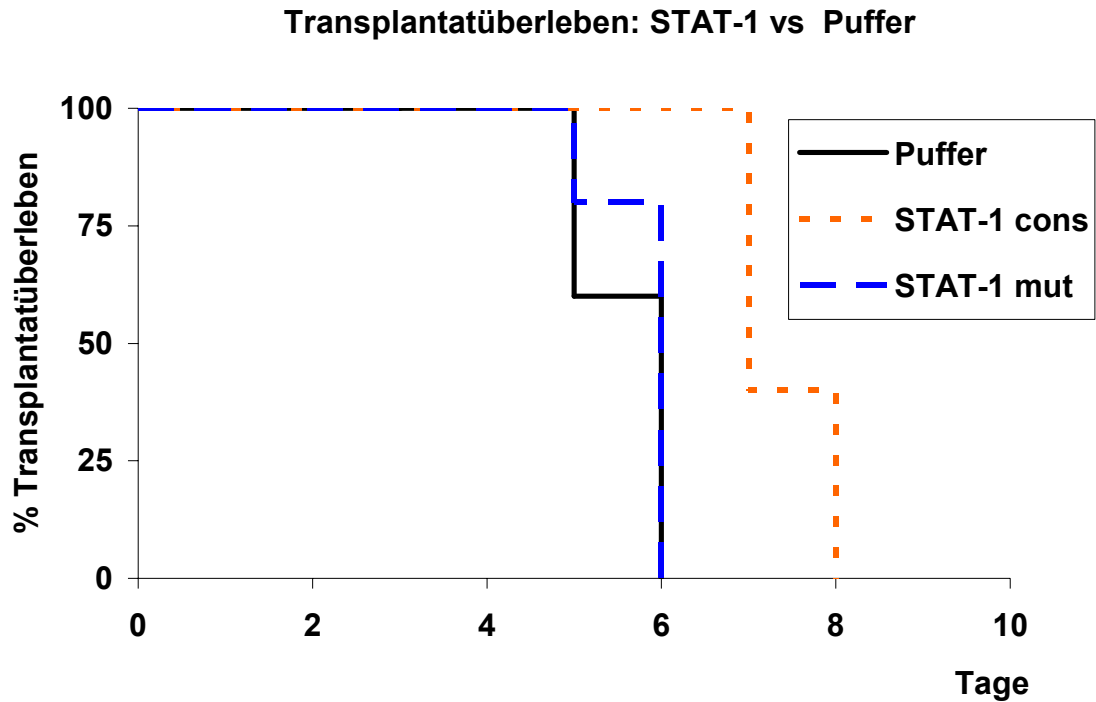
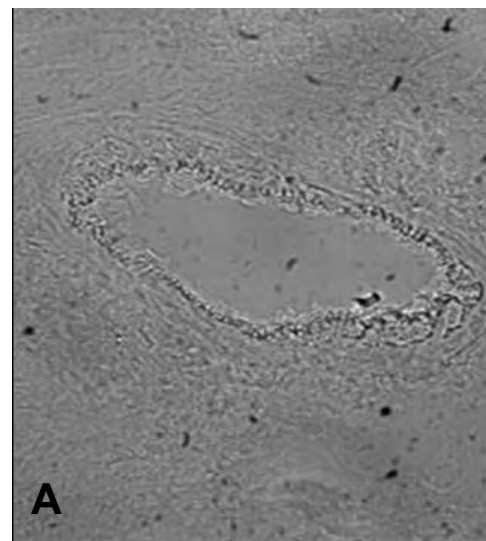


Abb. 37: Das Transplantatüberleben in Prozent der mit ODN-Decoys behandelten Tiere im Vergleich mit der unbehandelten Kontrollgruppe (Puffer): Nur durch die Behandlung mit den spezifischen ODN-Decoys (Stat-1 und AP-1 cons) konnte das Transplantatüberleben in beiden Gruppen signifikant verlängert werden (von Akut: 5.6 ± 0.5 Tage auf STAT-1: $7.4 \text{ Tage} \pm 0.5$, bzw. AP-1: $7.8 \text{ Tage} \pm 1$, $n=5/\text{Tag}/\text{Gruppe}$)(Wilcoxon-U-Test).

3.3.3 Nachweis der fluoreszenzmarkierten Decoys im Transplantatgewebe

Die mit dem Fluoreszenzfarbstoff Texasrot markierten Decoys wurden nach der auf 45 Minuten normierten warmen Ischämie der perfundierten Transplantate im Gewebe nachgewiesen. Dabei zeigte sich, dass es zu einer Konzentrierung der Decoys in den Endothelzellen des Transplantates kommt.

**Gefäß im
Transplantat
(ohne Fluoreszenzfilter)**



**Endotheliale
Kumulation
der markierten Decoys**

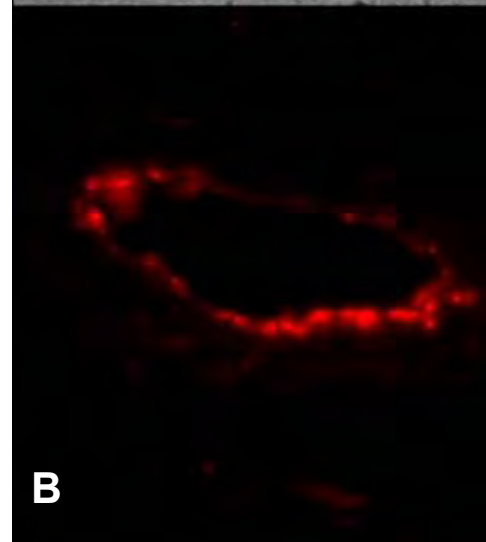


Abb. 38: Nachweis der markierten Decoys in den Transplantaten: Es kommt zu einer deutlichen Anhäufung der mit Texasrot markierten Decoys in den Endothelzellen des Transplantates (Bsp.:STAT-1). A: Darstellung des Endothels ohne Fluoreszenzfilter, B die floureszierenden Decoys im Endothel des Transplantates.

3.3.4 Immunhistochemie

3.3.4.1 Adhäsionsmoleküle

3.3.4.1.1 ICAM-1

In der Frühphase der akuten Abstoßung bilden Adhäsionsmoleküle eine zentrale Rolle für die ersten Zell-zu-Zell-Interaktionen. Durch die Inhibition der beiden Transkriptionsfaktoren AP-1 und STAT-1 konnte die Expressierung des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 signifikant vermindert werden. Dies galt sowohl am ersten als auch am dritten Tag nach der Transplantation. Am ersten Tag war bei den unbehandelten, nur mit der Pufferlösung perfundierten Tieren mit ca. 60% die Gruppe mit dem Färbegrad 3, d.h. mit der maximalen Anfärbung auf den Antikörper, am größten und nur ca. 10% der Gefäße waren in dieser Gruppe nicht angefärbt. Demgegenüber konnte durch die Inhibition des Transkriptionsfaktors STAT-1 die Anzahl der nicht angefärbten Gefäße auf ca. 50% erhöht werden und nur ca. 15% der Gefäße zeigten den Färbegrad 3. Auch durch die Inhibition des Transkriptionsfaktors AP-1 verringerte sich die ICAM-1-Expression. In dieser Gruppe waren ca. 25% der Gefäße gar nicht angefärbt und nur ca. 30% mit dem Färbegrad 3 eingeteilt.

Auch am dritten Tag waren ohne Behandlung ca. 60% der Gefäße maximal angefärbt. An diesem Tag waren nur ca. 5% in der Puffer Gruppe ohne Färbung. Wieder konnte durch die Decoy-Behandlung die Expression des Adhäsionsmoleküls signifikant vermindert werden. So waren in der STAT-1-Gruppe ungefähr die Hälfte ohne jegliche Anfärbung und nur ca. 8% zeigten den Färbegrad 3. Auch in der AP-1-Gruppe waren nur ca. 12% der Gefäße mit der maximalen Färbung zu sehen und ca. 30% der Gefäße zeigten keine Anfärbung auf den Antikörper.

3.3.4.1.2 VCAM-1

Bei dem Adhäsionsmolekül VCAM-1 war in beiden Gruppen die VCAM-1-Expression am ersten Tag bis auf das Niveau von nicht transplantierten Kontrollherzen reduziert. Bei den unbehandelten Tieren waren fast 50% der Gefäße maximal angefärbt und im Gegensatz dazu konnten nach der Decoy-Behandlung fast keine Gefäße mit diesem Färbegrad gefunden werden. Auf der anderen Seite konnte man bei den unbehandelten Tieren fast keine nicht angefärbten Gefäße finden, wobei nach der Decoy-Behandlung in beiden Gruppen ca. 60% der Gefäße keine Anfärbung zeigten. Diese Werte entsprechen in etwa den Werten von den nicht transplantierten nativen Herzen (Native).

Dieser Effekt hielt jedoch nicht in diesem Ausmaß bis zum dritten Tag nach der Transplantation an. Hier war nur eine leichte Verschiebung zu den geringeren Färbegraden in den Decoy-Gruppen zu finden.

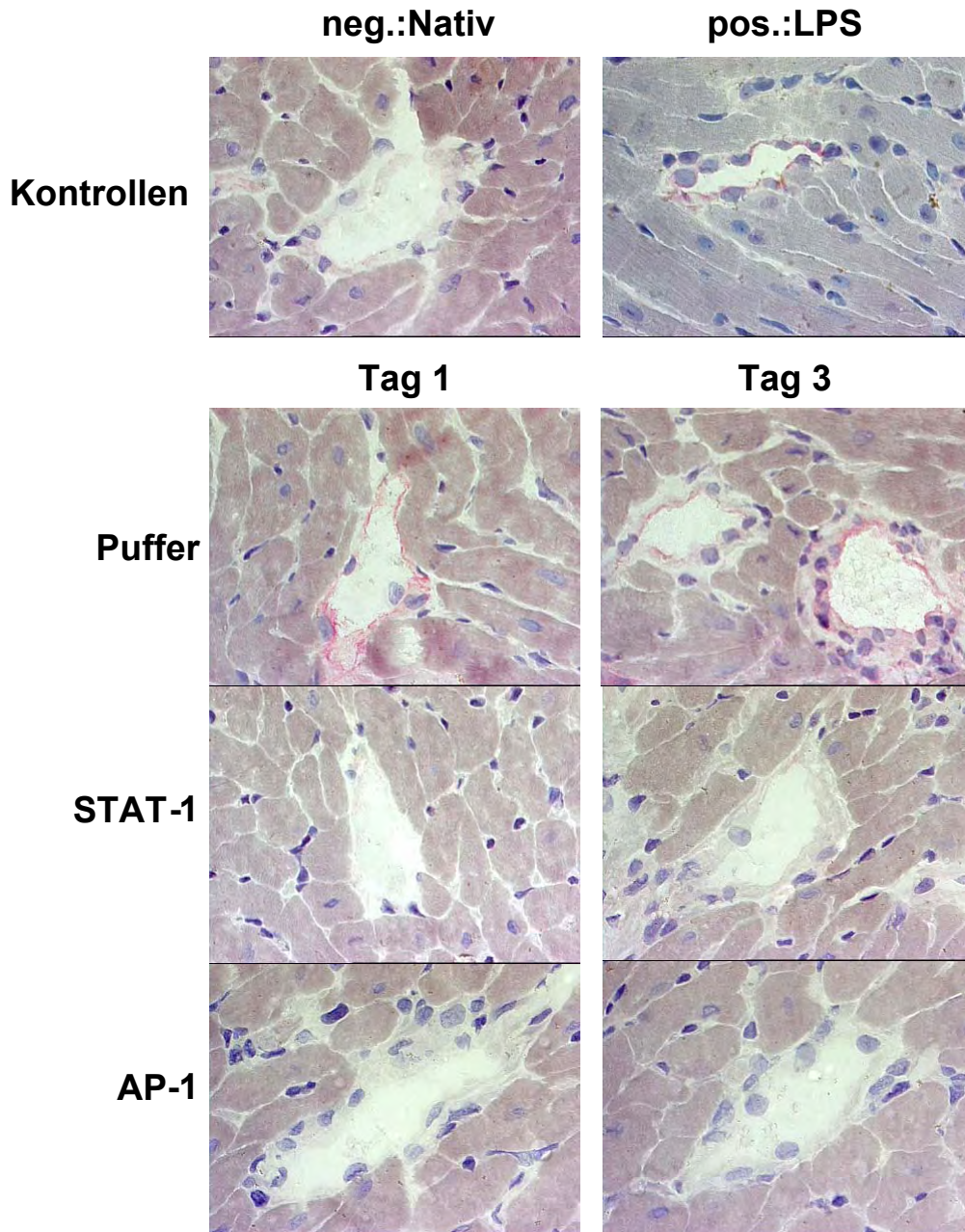


Abb. 39: Immunhistochemie ODN ICAM-1: Sowohl die Inhibition von STAT-1 als auch von AP-1 führt zu einer verminderten Expression des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 im Vergleich zu den unbehandelten Kontrolltieren (Puffer) (400-fache Vergrößerung). Als Färbekontrollen dienten als negative Kontrolle nicht transplantierte Herzen (Native) und durch LPS stimulierte Herzen (LPS) als positive Kontrolle.

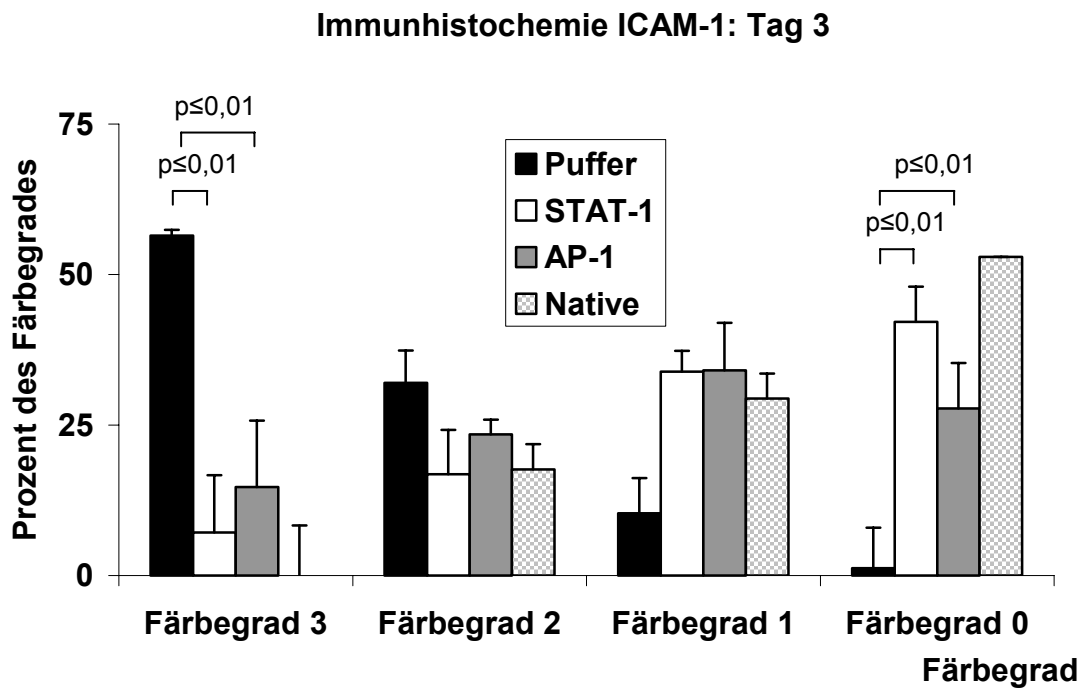
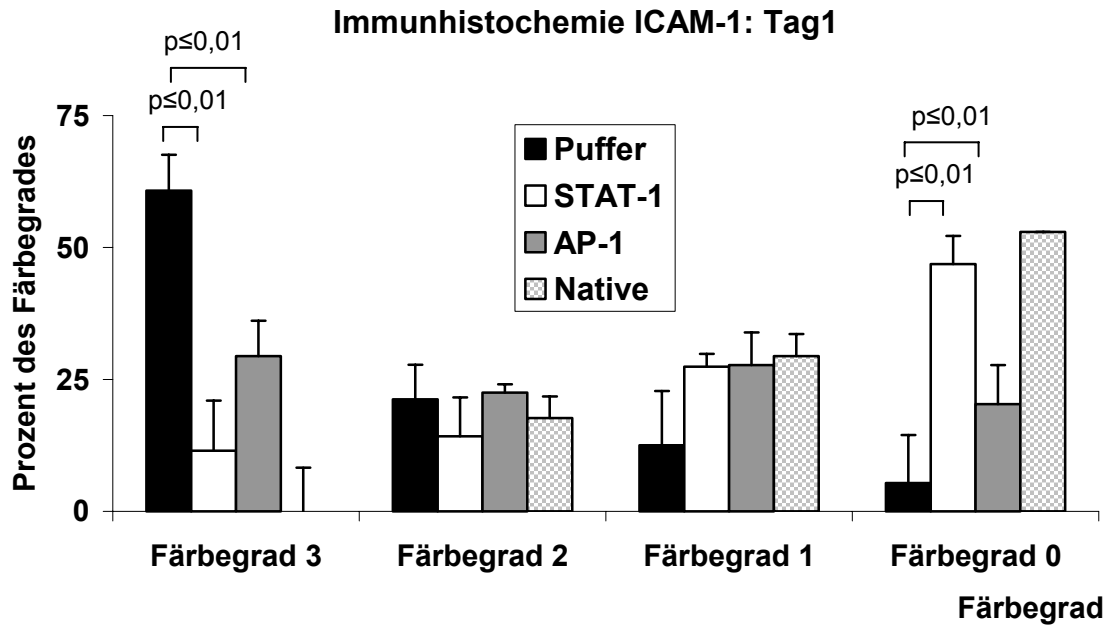


Abb. 40: Immunhistochemie ODN ICAM-1: Durch beide Decoys konnte eine signifikante Reduktion der Expression des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 sowohl am Tag 1 als auch am Tag 3 post Transplantationem im Vergleich zu den unbehandelten Kontrolltieren (Puffer) erreicht werden. Dies wurde durch die Erfassung der immunhistochemischen Anfärbung in verschiedene Färbegrade (0-3) erfasst. (Darstellung: Mittelwerte der prozentualen Verteilung ($n=4/\text{Tag}/\text{Gruppe}$) (Wilcoxon-U-Test)).

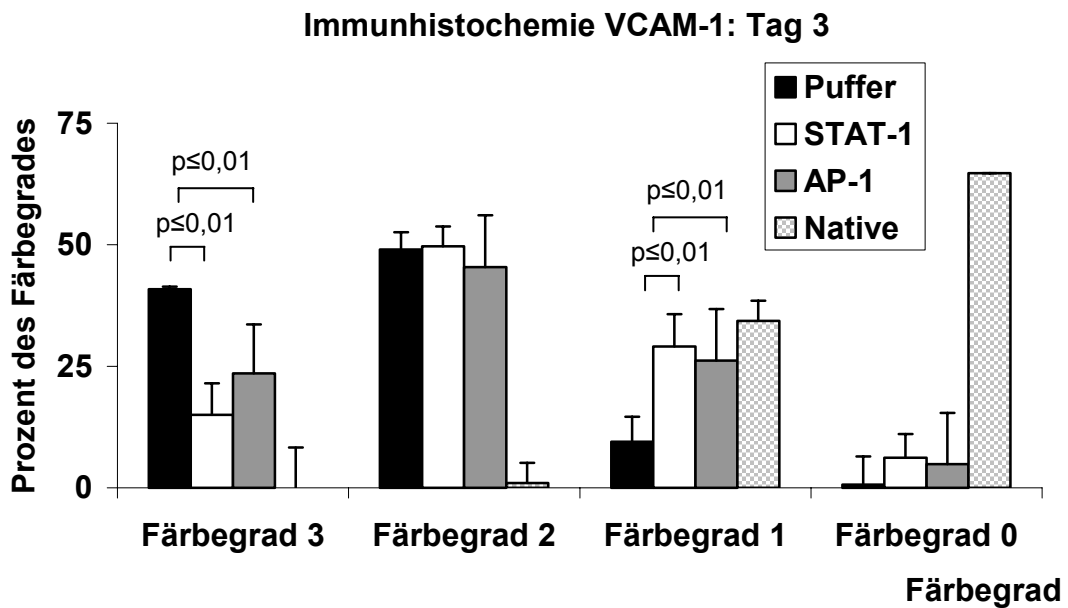
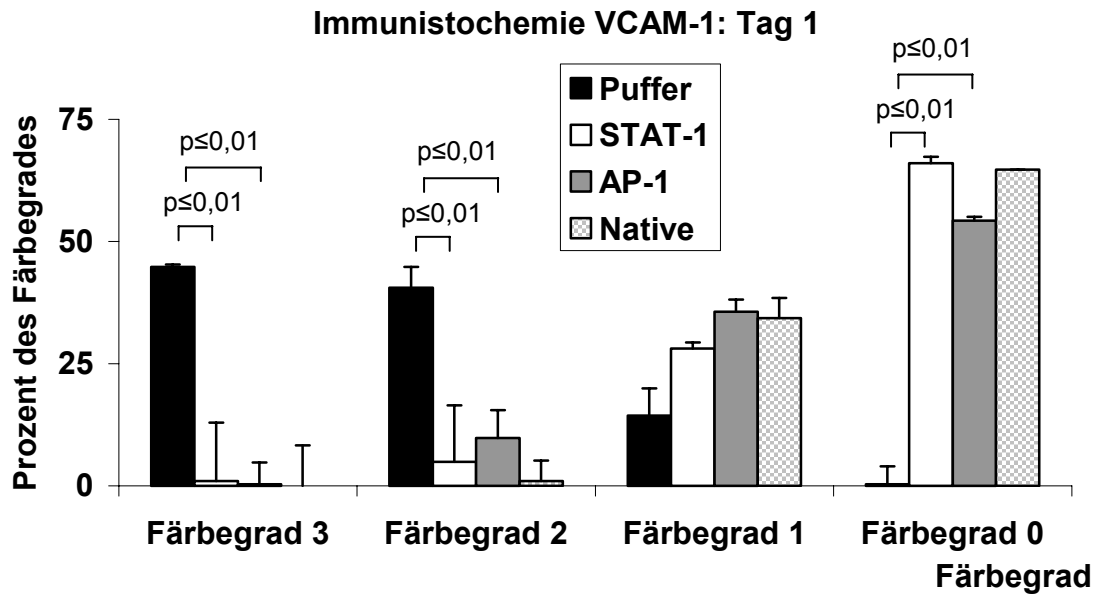


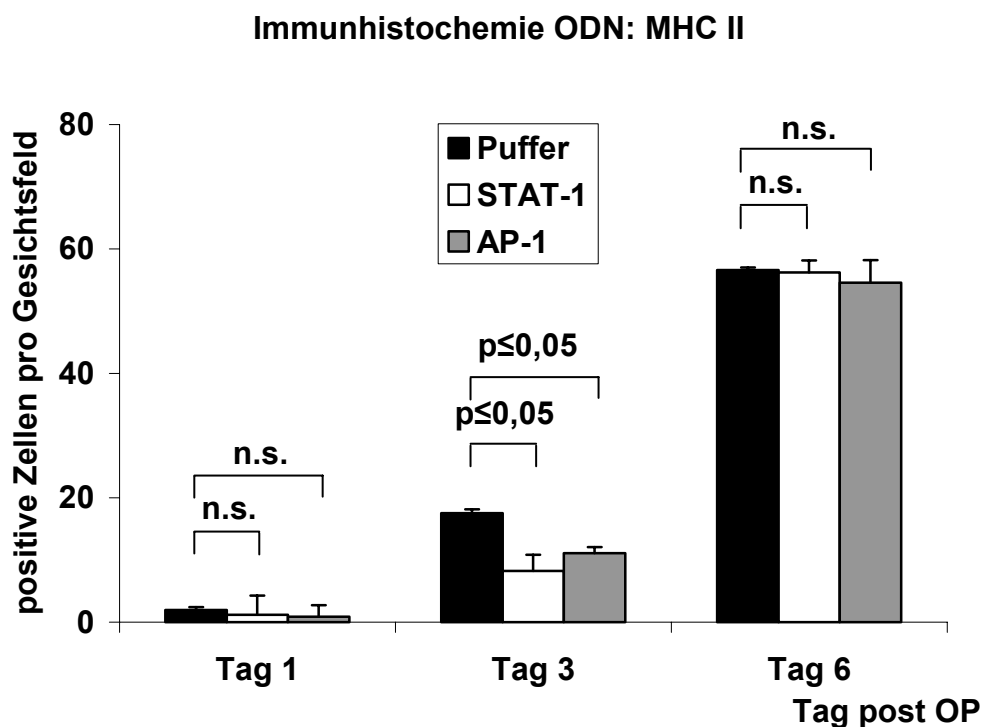
Abb. 41: Immunhistochemie ODN VCAM-1: Am ersten Tag kommt es durch die Decoy-Behandlung zu einer fast vollständigen Inhibition der Expression des Adhäsionsmoleküls im Vergleich mit den unbehandelten Kontrolltieren (Puffer). Auch am dritten Tag ist eine leichte Reduktion feststellbar. Dies wurde durch die Erfassung der immunhistochemischen Anfärbung in verschiedenen Färbegraden (0-3) gezeigt. (Darstellung: Mittelwerte der prozentualen Verteilung (n=4/Tag/Gruppe))(Wilcoxon-U-Test).

3.3.4.2 Zelluläre Infiltration

Ohne eine immunsuppressive Behandlung kam es im Zeitverlauf der akuten Abstoßung zu einer progredienten Infiltration mit mononukleären Zellen. Um diese zu quantifizieren, wurden die Organschnitte mit einem MHC II-Antikörper angefärbt. Hier zeigte sich, dass in beiden Decoy behandelten Gruppen die zelluläre Infiltration am Tag 3 signifikant reduziert werden konnte.

3.3.4.2.1 MHC II

A



B

MHC II	Native	Tag 1	Tag 3	Tag 6	
	0.0 ± 0.0	1.9 ± 1.6	17.5 ± 7.2	56.6 ± 6.5	Puffer
		1.2 ± 1.4	8.2 ± 4.4	56.2 ± 6.1	STAT-1
		0.9 ± 1.0	11.1 ± 4.6	54.6 ± 6.8	AP-1

Abb. 42: Immunhistochemie ODN MHC II positiver Zellen: Am Tag 3 wurde durch die Decoy-Behandlung die Infiltration mit immunkompetenten, MHC II positiven Zellen signifikant reduziert im Vergleich zu den unbehandelten Kontrolltieren (Puffer). Darstellung der Mittelwerte und der Standardabweichung als Grafik(A) und Tabelle (B)(Wilcoxon-U-Test).

3.3.4.2.2 Monozyten/Makrophagen und T-Zellen

Auch in der spezifischen Reduktion von Monozyten/Makrophagen erwiesen sich die Decoys als eine wirksame Methode. So reduzierte sowohl die Perfusion mit STAT-1 Decoys als auch von AP-1-Decoys die Infiltration der ED-1 positiven Zellen am Tag 3 signifikant.

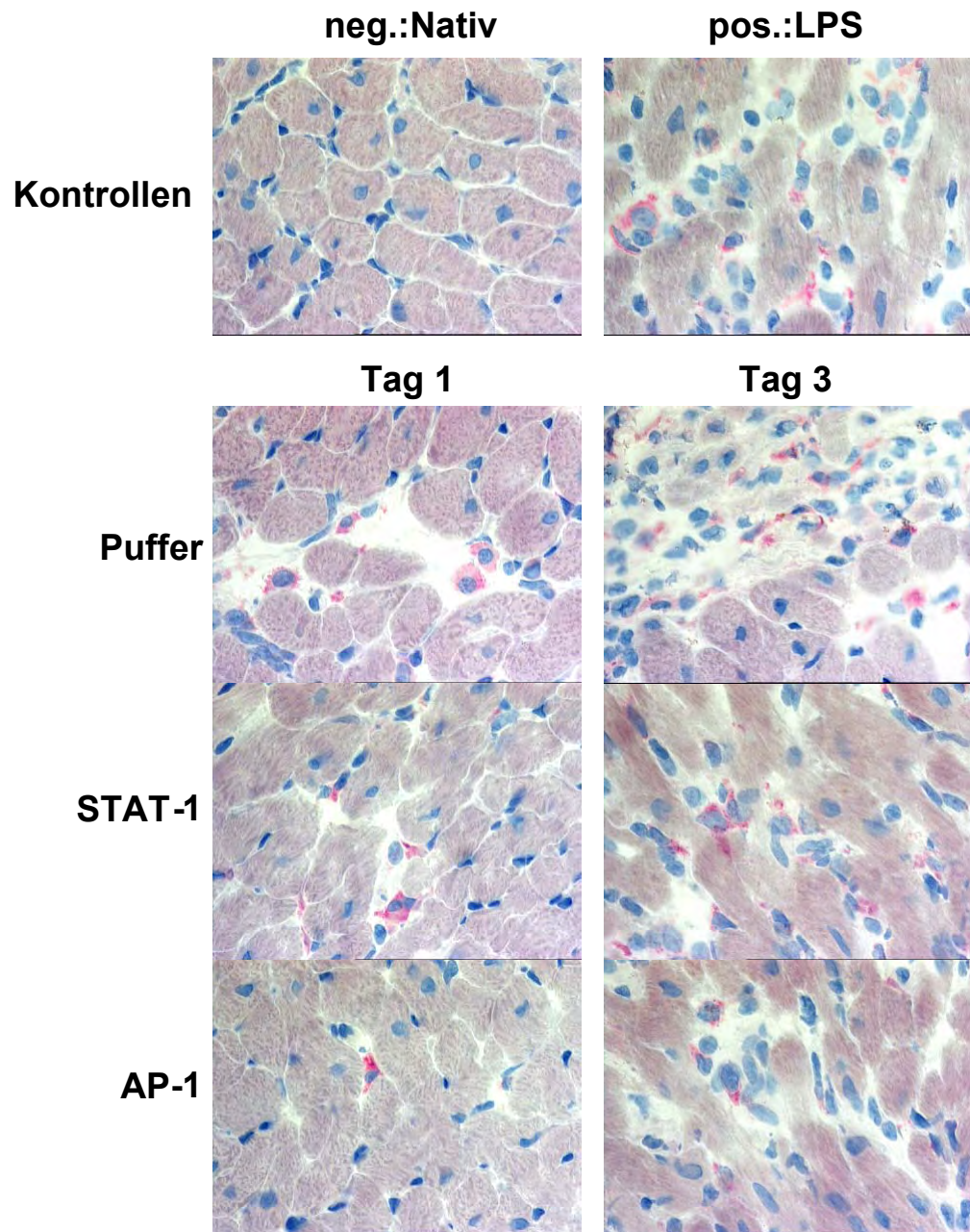
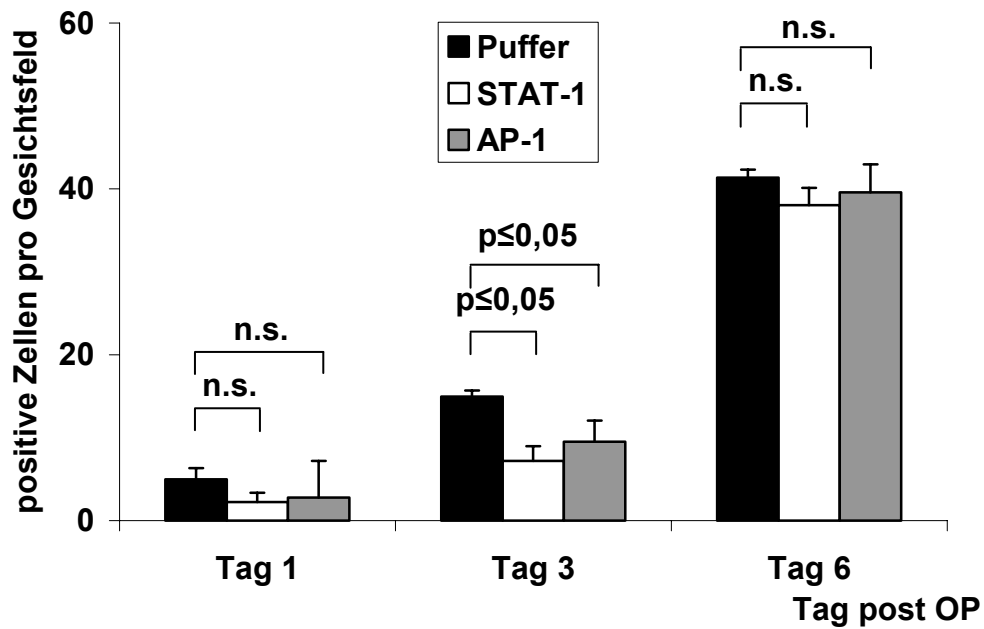


Abb. 43: Immunhistochemie ODN ED-1: Sowohl die Inhibition von STAT-1 als auch von AP-1 führte zu einer Reduktion der Infiltration mit ED 1 positiven Monozyten / Makrophagen im Vergleich zu den unbehandelten Kontrolltieren (Puffer). (400-fache Vergrößerung).

A

Immunhistochemie ODN: ED 1



B

ED 1	Native	Tag 1	Tag 3	Tag 6	
	0.1 ± 0.1	5.0 ± 3.0	14.9 ± 6.8	41.4 ± 8.2	Puffer
		2.2 ± 1.9	7.2 ± 4.6	38.0 ± 7.6	STAT-1
		2.8 ± 2.3	9.5 ± 5.1	39.6 ± 6.9	AP-1

Abb. 44: Immunhistochemie ODN ED-1 (Monozyten/Makrophagen): Auch die Infiltration von Monozyten konnte durch die Decoy-Behandlung signifikant reduziert werden im Vergleich zu den unbehandelten Kontrolltieren (Puffer) ($n=5/\text{Tag}/\text{Gruppe}$) (Wilcoxon-U-Test). Darstellung der Mittelwerte und der Standardabweichung als Grafik(A) und Tabelle (B).

Bei der immunhistochemischen Auswertung der Infiltration der Transplantate mit Alpha/Beta T-Zellrezeptor positiven T-Zellen (Klon R73) zeigte sich, dass trotz des nur einmaligen Einsatzes der Decoys vor der Reperfusion des Transplantates sowohl am Tag 3 als auch am Tag 6 eine spezifische Reduktion erzielt werden konnte.

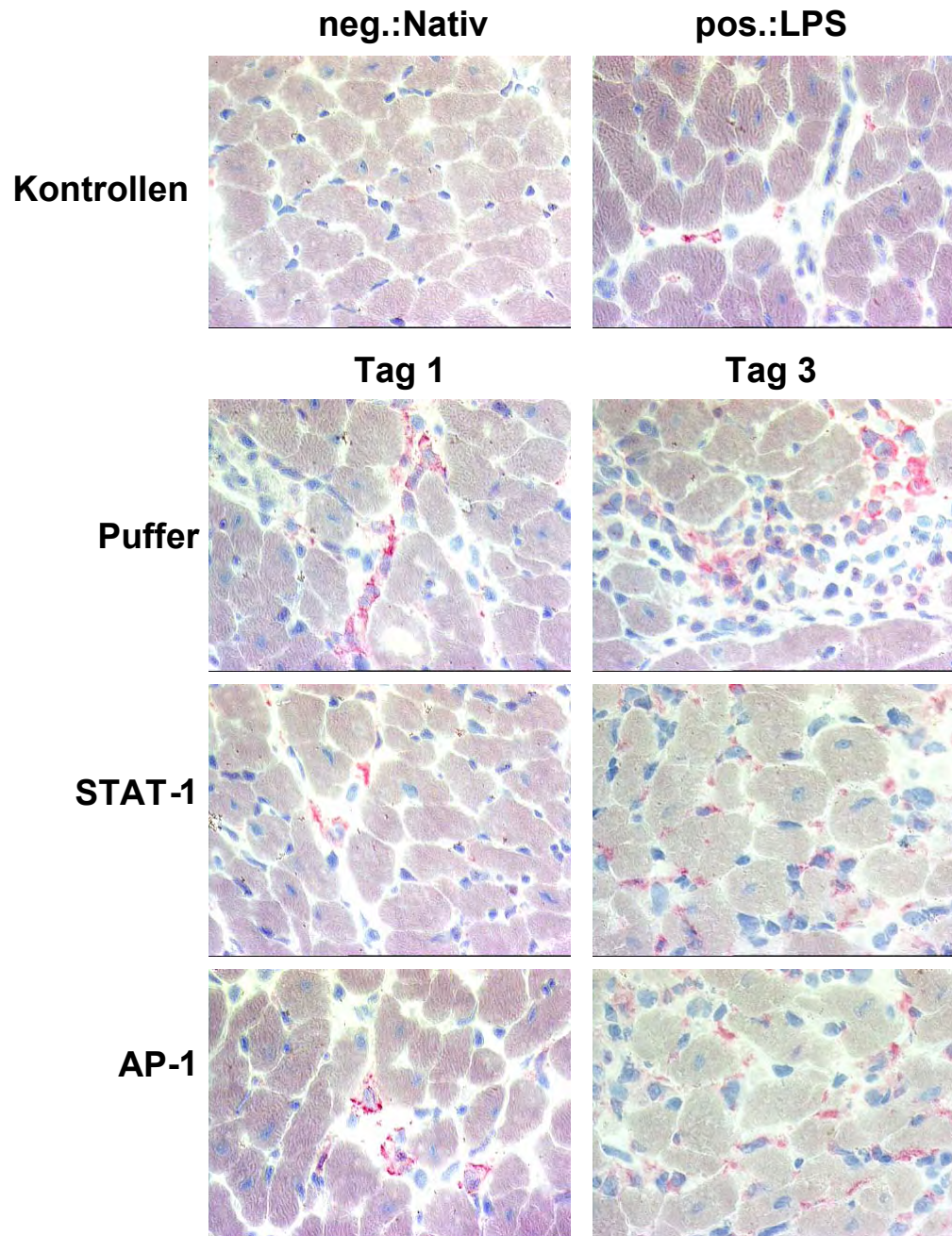
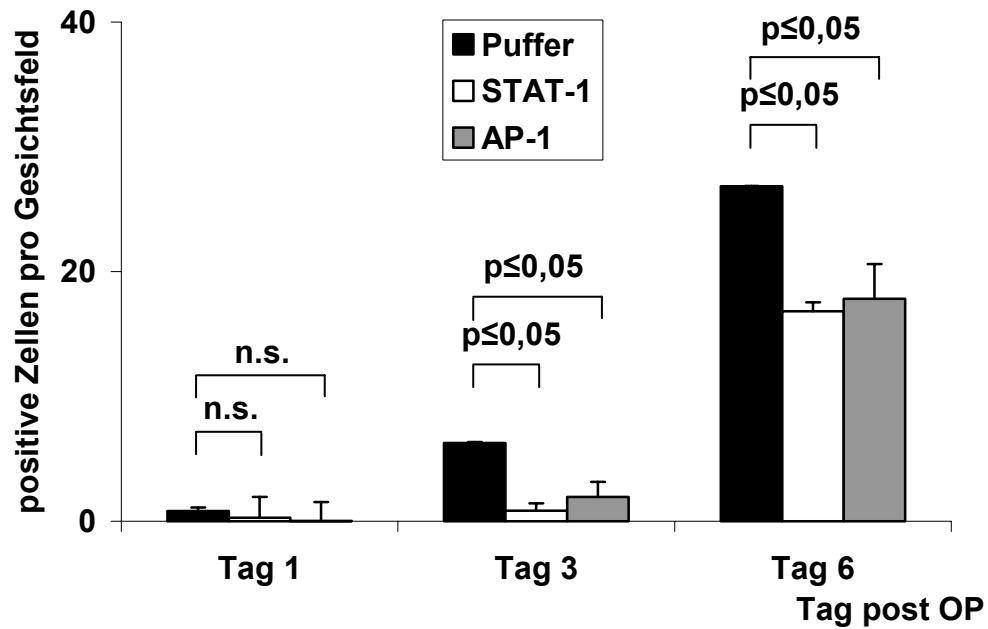


Abb. 45: Immunhistochemie ODN R73 (T-Zellen): Durch die Inhibition von STAT-1 als auch von AP-1 reduziert sich die Infiltration mit R 73 positiven T-Zellen am Tag 3 und Tag 6 post Transplantationem im Vergleich zu den unbehandelten Kontrolltieren (Puffer) (400-fache Vergrößerung)

A

Immunhistochemie ODN: R 73



B

	Native	Tag 1	Tag 3	Tag 6	
R 73	0.0 ± 0.0	0.8 ± 1.0	6.3 ± 4.1	26.8 ± 8.7	Puffer
		0.3 ± 0.5	0.9 ± 1.4	16.8 ± 5.8	STAT-1
		0.0 ± 0.1	1.9 ± 1.9	17.8 ± 7.1	AP-1

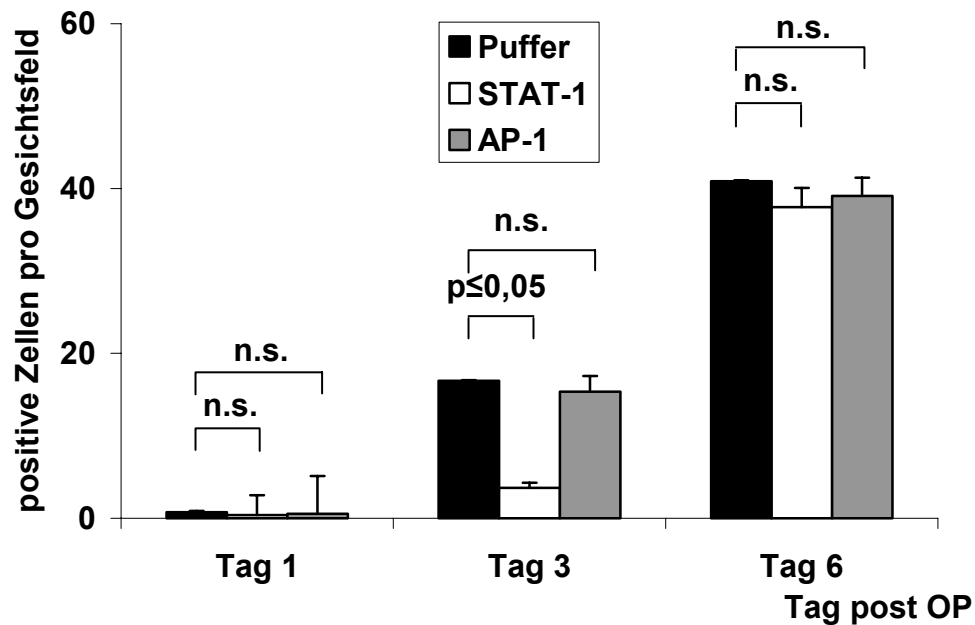
Abb. 46: Immunhistochemie ODN R73 (T-Zellen): Durch die einmalige Behandlung der Transplantate mit den ODN-Decoys konnte die Infiltration mit T-Zellen am dritten und zusätzlich am sechsten Tag nach der Transplantation signifikant reduziert werden im Vergleich zu den unbehandelten Kontrolltieren (Puffer) ($n=5/\text{Tag}/\text{Gruppe}$). Darstellung der Mittelwerte und der Standardabweichung als Grafik(A) und Tabelle (B)(Wilcoxon-U-Test).

3.3.4.2.3 iNOS

Bei der Auswertung der Infiltration mit iNOS positiven Zellen zeigte sich zum erstenmal ein deutlicher Unterschied in der Auswirkung der Inhibition der beiden Transkriptionsfaktoren. So konnte durch die Perfusion mit dem STAT-1-Decoy die Infiltration am Tag 3 fast komplett verhindert werden. Demgegenüber reduzierten die AP-1-Decoys die Anzahl der iNOS positiven Zellen nur minimal. Dies zeigt einen STAT-1-spezifischen Effekt auf die Infiltration der iNOS positiven Zellen.

A

Immunhistochemie ODN: iNOS



B

	Native	Tag 1	Tag 3	Tag 6	
iNOS	0.1 ± 0.1	0,7 ± 0,9	16,7 ± 4,9	40,9 ± 8,6	Puffer
		0,4 ± 0,6	3,7 ± 2,4	37,7 ± 7,5	STAT-1
		0,5 ± 0,7	15,4 ± 5,1	39,1 ± 7,4	AP-1

Abb. 47: Immunhistochemie ODN iNOS positive Zellen: Durch die Inhibition des Transkriptionsfaktors STAT-1 konnte die Infiltration mit iNOS positiven Zellen am Tag 3 nahezu komplett verhindert werden im Vergleich zu den unbehandelten Kontrolltieren (Puffer). Durch die AP-1-Decoys wurden die iNOS positiven Zellen nur minimal reduziert (n=5/Tag/Gruppe). Darstellung der Mittelwerte und der Standardabweichung als Grafik(A) und Tabelle (B) (Wilcoxon-U-Test).

3.3.5 Molekularbiologische Untersuchungen

3.3.5.1.1 Adhäsionsmoleküle

Um festzustellen, ob die histologisch festgestellte Reduktion der Expression der Adhäsionsmoleküle auch auf der Ebene der mRNA nachzuweisen ist, wurden die Gesamtllysate der Herzen mit Hilfe der Technik der semiquantitativen RT-PCR untersucht. Hier zeigte sich, dass sowohl durch die Inhibition des Transkriptionsfaktors STAT-1 als auch des Transkriptionsfaktors AP-1 an keinem Tag ein Unterschied der mRNA-Konzentration des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 nachzuweisen war.

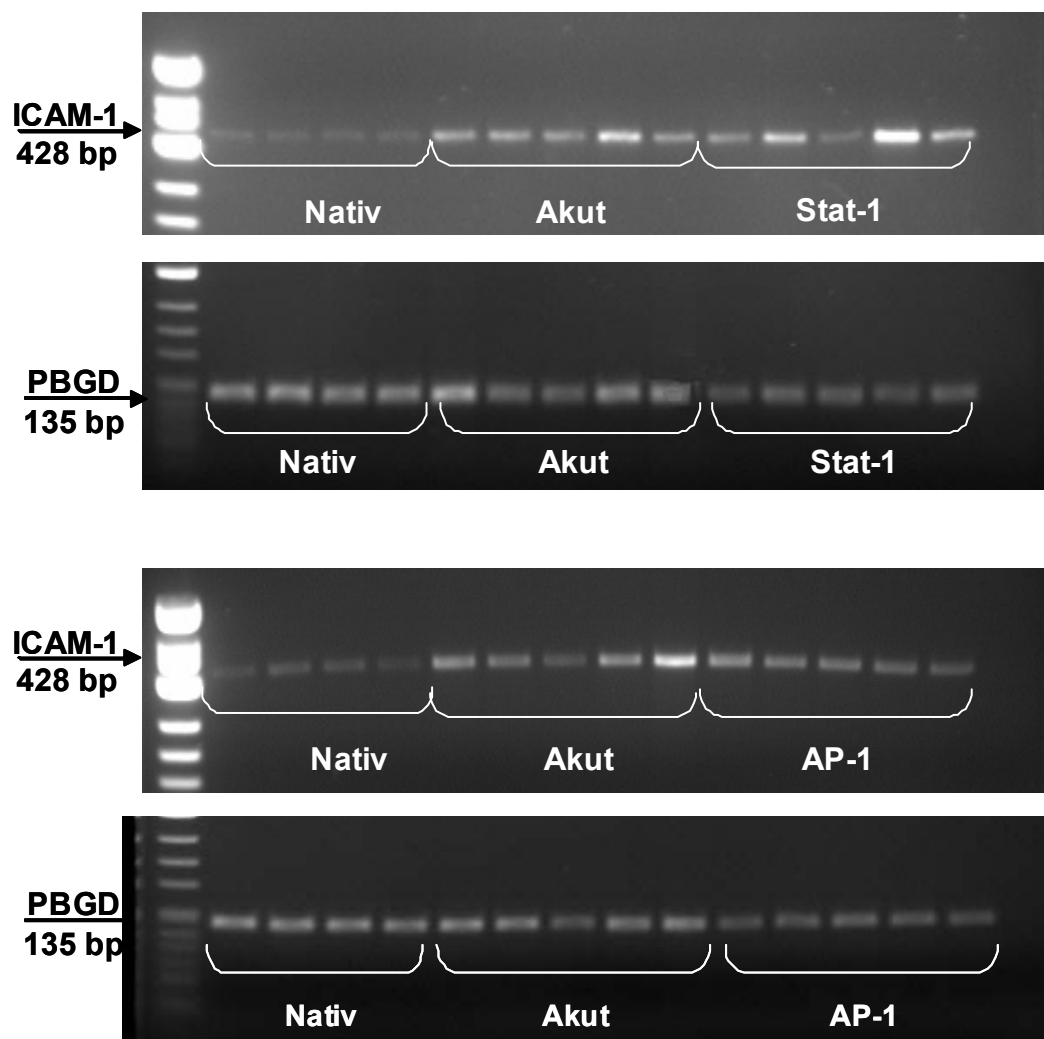


Abb. 48 Die PCR-Produkte von ICAM-1 und VCAM-1 am Tag 3: Es kam zu keinem signifikanten Unterschied in der relativen Konzentration der mRNA im Vergleich zu den unbehandelten Kontrolltieren (Akut) ($n=4/\text{Tag}/\text{Gruppe}$).

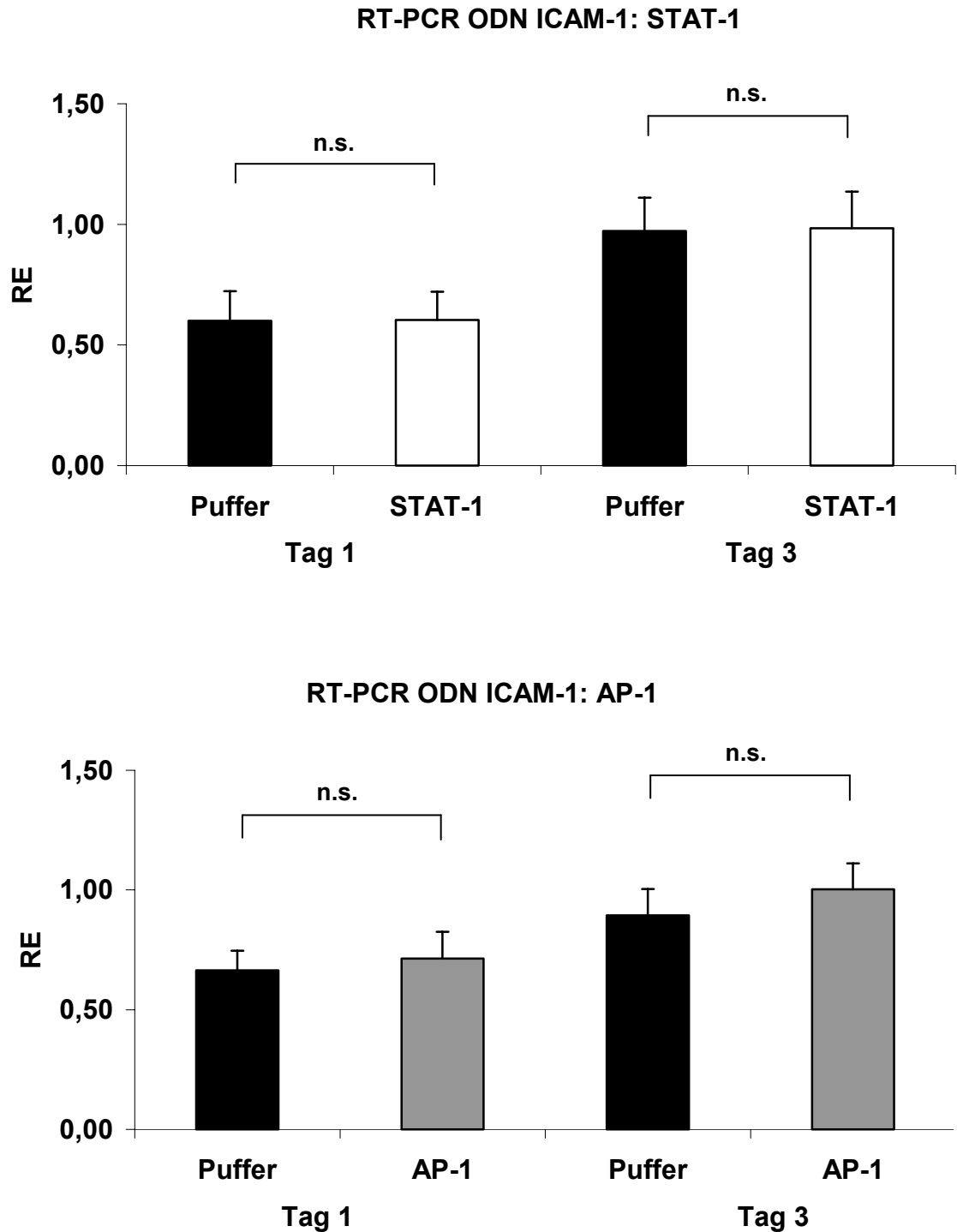


Abb. 49: RT-PCR ODN ICAM-1: In beiden Decoy-behandelten Gruppen kam es zu keinem signifikanten Unterschied zu den unbehandelten, akut abstoßenden Tieren (Puffer) in der Konzentration der mRNA des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 ($n=5/\text{Tag}/\text{Gruppe}$). Darstellung der Mittelwerte der Relativen Einheiten (RE) und der Standardabweichung (Wilcoxon-U-Test).

Auch bei der relativen Expression des zweiten untersuchten Adhäsionsmoleküls, VCAM-1 konnte nach der Decoy-Behandlung kein Unterschied zu den nicht behandelten Tieren festgestellt werden.

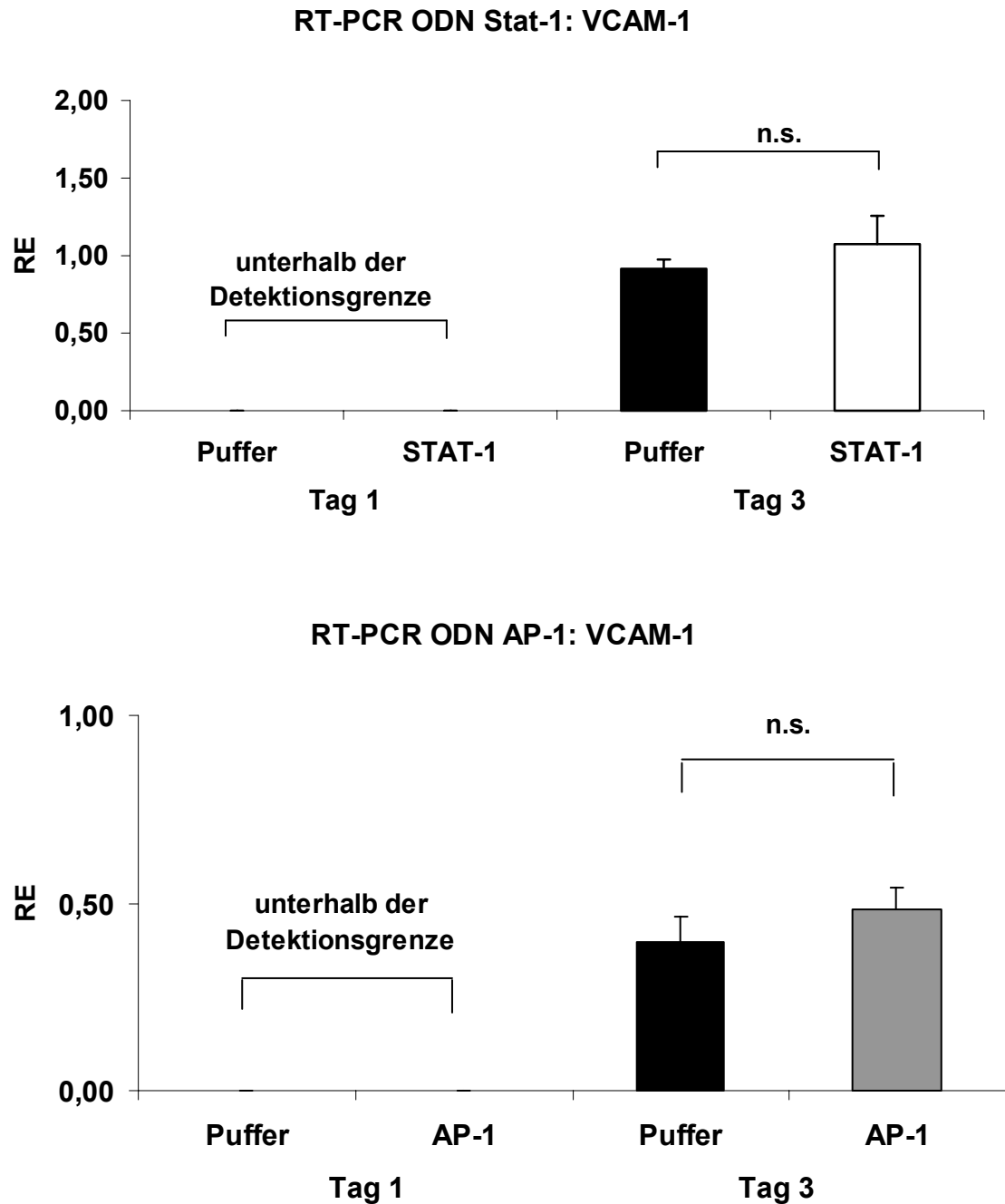


Abb. 50: RT-PCR ODN VCAM-1: Bei der mRNA-Konzentration des Adhäsionsmoleküls VCAM-1 konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden zwischen den Decoy-behandelten Gruppen und den unbehandelten Tieren (Puffer) ($n=5/\text{Tag}/\text{Gruppe}$) Darstellung der Mittelwerte der relativen Einheiten (RE) und der Standardabweichung (Wilcoxon-U-Test).

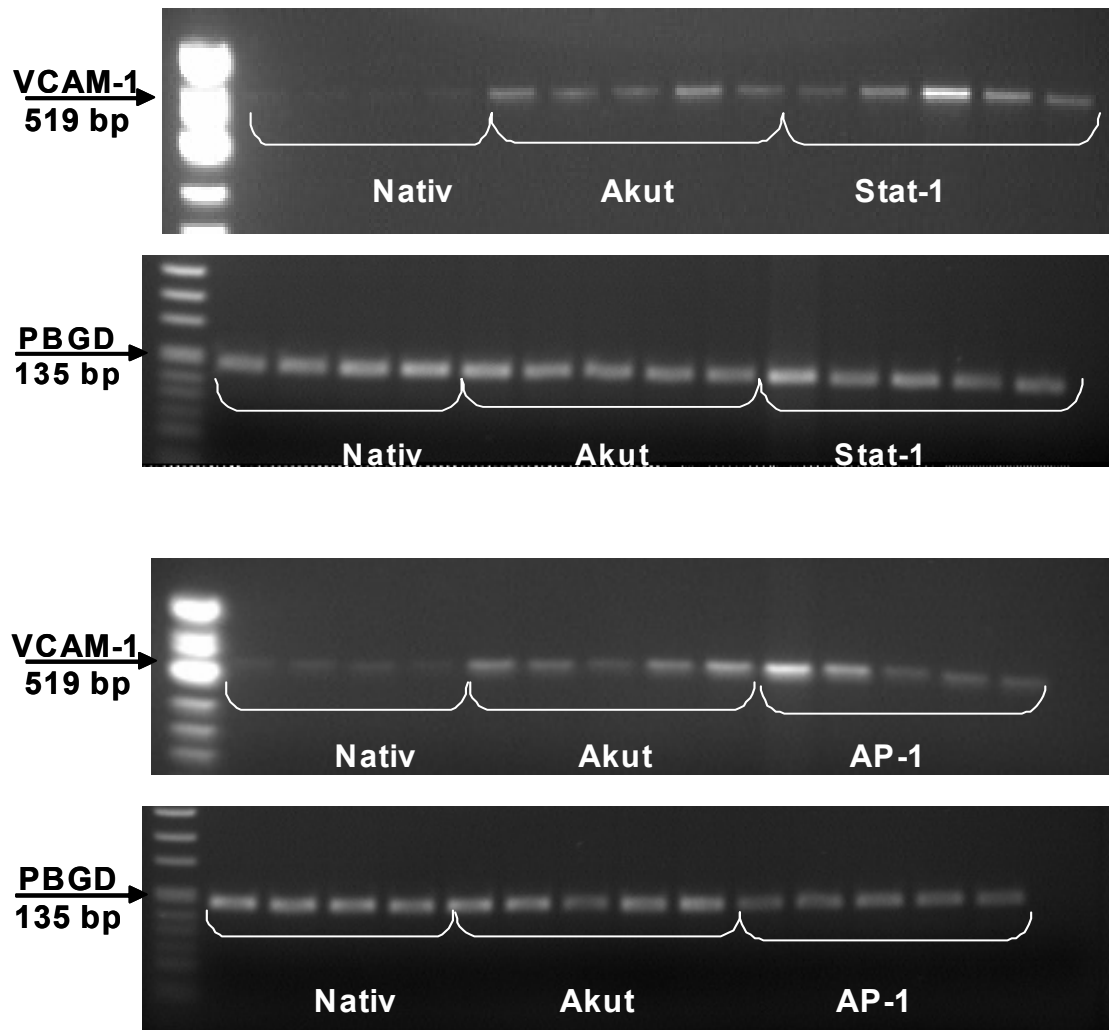


Abb. 51 Die PCR Produkte von ICAM-1 und VCAM-1 am Tag 3: Es kam zu keinem sigifikanten Unterschied in der relativen Konzentration der mRNA der Adhäsionsmoleküle im Vergleich zu den unbehandelten Kontrolltieren (Puffer) (n=4/Tag/Gruppe).

4 Diskussion

Ziel der Studie war es, die Mechanismen der akuten Transplantatabstoßung und mögliche Strategien zur Modulation der Pathomechanismen zu untersuchen. Hierzu wurde mit einem etablierten Standardmodell gearbeitet, bei dem die Transplantate ohne immunsuppressive Therapie innerhalb von $5,7 \pm 0,5$ Tagen abgestoßen wurden. In diesem Modell kam es in der Frühphase zur Hochregulation der Adhäsionsmoleküle (ICAM-1 und VCAM-1) und im zeitlichen Verlauf zur progredienten Infiltration mit immunkompetenten Zellen, wie z.B. Monozyten/Makrophagen oder T-Zellen. Zusätzlich konnte nachgewiesen werden, dass es unter der akuten Abstoßung zu einer Erhöhung der mRNA-Konzentration des Botenstoffes IL-2 und des Chemokins MCP-1 kam.

Im Mittelpunkt der ersten Teilstudie stand die Substanz 3-Deazaadenosin (c3Ado), die sowohl bei *In-vitro*, als auch bei *In-vivo* Versuchen immunmodulatorische und anti-inflammatorische Fähigkeiten gezeigt hat [96] [95] [120] [97] [100] [102] [101]. Durch dieses Potential von c3Ado sollte die Immunantwort des Empfängers so moduliert werden, dass es zu einer Transplantatprotektion kommt. In den Versuchen zeigten sich vor allem folgende Effekte: c3Ado konnte die Expression sowohl des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 als auch VCAM-1 stark vermindern. Daraus resultierte eine signifikante Reduktion der Infiltration der Transplantate. Die verminderte Infiltration zeigte sich anhand der MHC II positiven Zellen und auch durch die spezifische Auswertung der Infiltration mit Monozyten/Makrophagen und T-Zellen. Im Gesamtlysat der Transplantate konnte kein Unterschied in der mRNA-Konzentration von IL-2 und MCP-1 festgestellt werden. Darüber hinaus kam es trotz der deutlichen Verminderung der Infiltration zu keiner Verlängerung des Transplantatüberlebens. Dies könnte damit zusammen hängen, dass die Induktion der Apoptose durch c3Ado nicht verhindert werden konnte.

Ziel der zweiten Versuchsreihe war es, durch den Einsatz von sowohl AP-1- als auch STAT-1-ODN-Decoys die Antigenität des Transplantates durch die Beeinflussung der intrazellulären Aktivierung zu verändern und damit die Immunantwort des Empfängers zu vermindern. Hier ergaben sich hauptsächlich folgende Ergebnisse: Durch die Perfusion der Transplantate mit den in kardiopleger Lösung gelösten Decoys kam es zur Aufnahme der Decoys in die Endothelzellen der Transplantate. Dies konnte durch Fluoreszenzmarkierung nachgewiesen werden. Dadurch kam es zu folgenden Effekten:

Die Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 konnte in der initialen Phase der akuten Abstoßung stark reduziert werden. Als Folge der Inhibition der Expression von ICAM-1 und VCAM-1 kam es am Tag 3 *post transplantationem* zu einer Reduktion der zellulären Infiltration der Transplantate. Dies galt insbesondere für die Infiltration mit T-Zellen, die sich bis zum Tag 6 nachweisen ließ. Durch die nur einmalige perioperative Anwendung der Decoys in der kardioplegen Lösung konnte darüber hinaus das Transplantatüberleben signifikant erhöht werden.

4.1 Die Wahl des Transplantationsmodelles

Trotz modernster Immunsuppressiva und der neuesten medikamentellen Protokolle kommt es nach Herztransplantationen zu akuten Abstoßungsperioden [83] [84] [85]. Die akute Abstoßung ist im ersten Jahr post Operationem einer der Hauptgründe für den Transplantatverlust und gilt darüber hinaus als mitverantwortlich für die chronische Transplantatdysfunktion [6] [7] [8] [9] [10].

Zur Erforschung des multifaktoriellen Geschehens der akuten Transplantatabstoßung stellen Tiermodelle eine Möglichkeit dar, Grundlagen aus der Forschung mit Zellkulturen in einem komplexen immunologischen Umfeld zu testen. Dabei bieten die etablierten Transplantationsmodelle bei Ratten den Vorteil, dass es sich um Tiere handelt, die in genetisch genau definierten Inzuchtlinien verfügbar sind, bei geschultem Operateur eine hohe Erfolgsquote zulassen und darüber hinaus auch relativ einfach artgerecht zu halten sind.

Die Besonderheit in dem hier gewählten Transplantationsmodell [25] besteht in dem genetischen Unterschied der beiden Rattenpopulationen. Zwischen der Linie der Spendertiere und der Linie der Empfängertiere besteht sowohl eine MHC-Klasse-I- als auch eine MHC-Klasse-II-Inkompatibilität und damit arbeitet man mit einem vollständig allogenen Transplantationsmodell. Dadurch erhält man immunologische Verhältnisse, die dem klinischen Bild beim Menschen entsprechen. Darüber hinaus kann man dieses Modell durch die reine Gabe von CsA in ein chronisches Abstoßungsmodell überführen, ohne Toleranz zu induzieren. Das heißt, trotz des Langzeitüberlebens unter der CsA-Therapie werden die Herzen abgestoßen, sobald das Immunsuppressivum abgesetzt wird. Dies beweist zusätzlich die Nähe zu den Verhältnissen in der humanen Herztransplantation.

Dass es sich um ein heterotopes und damit um ein „non-working-heart“ Modell handelt, d.h., dass das Herz nicht gegen den physiologischen Druck schlägt, spielt für die

immunologischen Untersuchungen vermutlich nur eine untergeordnete Rolle. Die heterotope Form der Herztransplantation gehört seit der Erstbeschreibung von Ono et al. 1969 [76] modifiziert nach Schmid [111] zu den etablierten Modellen. Diese Technik bietet mehrere Vorteile:

1. Die Möglichkeit der Operation ohne künstliche Hilfsmittel zur Anastomose (z.B. einem Cuff)
2. Die einfache Möglichkeit des Monitorings des Transplantatüberlebens
3. Die Abstoßung geht ohne den Verlust des Empfängertieres von statten
4. Die hohe Erfolgsquote
5. Die Möglichkeit der Operation ohne den Einsatz eines OP-Mikroskopes

Trotzdem sollte erwähnt werden, dass es auch Bemühungen gibt, die Abweichung des Modells von den physiologischen Bedingungen durch chirurgische Modifikationen zu beheben [77].

4.2 Die Immunmodulation mit c3Ado

Um akute Abstoßungsperioden zu erfassen und diese in einen Schweregrad einzuteilen, werden bei Transplantatempfängern routinemäßig in bestimmten Frequenzen Myokardbiopsien vorgenommen. In diesen Biopaten bilden parallel zu den zu Grunde liegenden Untersuchungen [63] [121] [11] [122] Zeichen einer Inflammation neben beginnender Nekrose und Myozytenverlust den zentralen Hinweis für die Einteilung des Schweregrades der Abstoßung, festgelegt in der Einteilung der „International Society for Heart and Lung Transplantation“ [123]. Die zentrale Rolle der Adhäsionsmoleküle in dem Prozess der Migration von immunkompetenten Zellen ist schon seit längerem bekannt [53] [89]. Daher waren diese Oberflächenmoleküle in mehreren Studien Ziel einer möglichen Transplantatprotektion und stehen im Zentrum laufender Untersuchungen [92] [91] [93] [124] [125] [89]. So konnten in Tiermodellen durch direkte Antikörper gegen Adhäsionsmoleküle das Transplantatüberleben signifikant verlängert und teilweise Toleranz induziert werden [90] [93] [126].

In der Studie zeigte sich, dass c3Ado die Expressierung sowohl von ICAM-1 als auch von VCAM-1 an den Tagen 1 und 3 post Transplantationem wirksam unterdrückte. Diese Fähigkeit von c3Ado, zwei der wichtigsten Vertreter aus der Ig-Superfamilie der Adhäsionsmoleküle sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zu inhibieren, zeigte sich auch in anderen Untersuchungen [95] [100] [102] [127] und wird teilweise mit dem Transkriptionsfaktor NF- κ B in Verbindung gebracht [127]. Die Feststellung, dass die

Konzentration der mRNA der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 sich in den beiden Gruppen nicht unterschied, könnte darauf hinweisen, dass der inhibierende Effekt des c3Ado auf einen post transkriptionellen Einfluss zurückzuführen ist. Es zeigte sich bei allen Transplantaten ein Anstieg in der Produktion der mRNA der Adhäsionsmoleküle, die allerdings im Vergleich mit den histologischen Befunden später einsetzt. Dies lässt darauf schließen, dass bereits präformierte Endprodukte in den Zellen vorhanden sind, die bei Bedarf in der Frühphase aus den Zellen ausgeschleust werden. Das heißt, dass vermutlich durch die c3Ado-Gabe ausschließlich die Expression der präformierten Endprodukte in der Frühphase verhindert werden konnte. Allerdings muss bedacht werden, dass die RT-PCR des Gesamtlisates möglicherweise nicht sensitiv genug ist, um die Konzentrationsunterschiede der mRNA in den Endothelzellen nachzuweisen. Durch die immunhistochemisch nachgewiesene Unterdrückung der Expression der Adhäsionsmoleküle sollte nun die feste Adhäsion und letztendlich die Migration von Abwehrzellen in das Transplantat wirksam verhindert werden.

Wie erwartet, resultierte die Reduktion von ICAM-1 und VCAM-1 auch in einer Verringerung der zellulären Infiltration. Dies wurde in der Studie zuerst anhand der MHC-II positiven, immunkompetenten Zellen gezeigt. Ganz spezifisch konnte durch die Gabe von c3Ado sowohl die Anzahl der das Transplantat infiltrierenden T-Zellen als auch die Infiltration mit Monozyten/Makrophagen vermindert werden. Damit reduzierte sich ein Hauptkriterium zur Einteilung des Schweregrades der Transplantatabstoßung [123].

Gerade die T-Zellen, aber auch die Monozyten gelten als Hauptvermittler der Effektormechanismen, die letztendlich zur Zerstörung des Transplantates führen, indem sie die Abstoßungskaskade initiieren. Um eine potenziell direkt zytotoxische Substanz zu erfassen [128] [129] wurde die Anzahl an iNOS positiven, NO produzierenden Zellen ermittelt. Bei der induzierbaren Form der NO-Synthetase wird die Produktion von NO über die Konzentration des Enzyms reguliert. Außerdem wird vermutet, dass der durch iNOS induzierte Anstieg von NO hauptsächlich bei pathologischen Vorgängen eine Rolle spielt. Auch die Anzahl der iNOS positiven Zellen konnte durch die Gabe von c3Ado signifikant reduziert werden.

Obwohl sich unter der Gabe des Immunmodulators c3Ado histologisch die Anzeichen der akuten Abstoßung stark verminderten, kam es zu keiner Verlängerung des Transplantatüberlebens. Auch wenn es sich bei der Wirkungsweise des c3Ado nicht um

eine Immunsuppression handelt, so wäre doch zu erwarten gewesen, dass sich die klar erfassbare Reduktion der infiltrierenden Zellen auch in einer Verminderung der zellvermittelten Effektormechanismen und damit zu einem verzögerten Zelluntergang und einer Verlängerung des Transplantatüberlebens führen sollte.

Um zu untersuchen, inwieweit dies evtl. mit einem zentralen Mechanismus des Zelltodes, der Apoptose zusammenhängt, wurden zwei unterschiedliche Nachweisverfahren verwandt. Auf histologischer Ebene konnten durch die TUNEL-Reaktion die Apoptoserate der Kardiomyozyten quantitativ erfasst werden. Hier zeigte sich zum Ersten, dass bei transplantierten Herzen die Apoptoserate der Kardiomyozyten erhöht ist. Außerdem zeigte sich, dass zwischen den beiden transplantierten Gruppen kein signifikanter Unterschied zu finden war. Zum anderen konnte die gesteigerte Apoptoserate zusätzlich auf molekularer Ebene nachgewiesen werden. Durch die elektrophoretische Auftrennung der DNA ließ sich die für den programmierten Zelltod typische Fragmentierung der DNA nachweisen, welche sich als sog. Leiter darstellt. In beiden Gruppen war im Gegensatz zu nicht transplantierten Kontrollen die Apoptoserate so gesteigert, dass sich die DNA-Fragmentierung nachweisen ließ.

Diese in beiden Gruppen gleichermaßen erhöhte Apoptoserate ist eine erstaunliche Beobachtung, da die Induktion der Apoptose mit der Infiltration des Transplantates in direkten Zusammenhang gesetzt wird [130] [131]. Des Weiteren gehen laut Studien die Expression von iNOS und das Auftreten einer erhöhten Rate des programmierten Zelltodes miteinander konform [70] [71] [132] [133]. In dieser Studie wurde durch die Gabe von c3Ado beides minimiert, aber der positive Einfluss auf die Apoptoserate blieb aus. Dies zeigt, dass die Signaltransduktionswege der Induktion der Apoptose weiter untersucht werden müssen.

Die Tatsache, dass die Anzahl der infiltrierenden Zellen reduziert, aber letztendlich die Einwanderung nicht komplett verhindert werden konnte, könnte darin begründet sein, dass es unter der gewählten Dosis des c3Ado zu einer Reduktion, aber nicht zu einer kompletten Inhibition der Expressierung von ICAM-1 und VCAM-1 gekommen ist. Die zuerst gewählte, an vorangegangenen Studien [101] orientierte höhere Dosis von 10mg/kg/KGW erwies sich aber in den vorab vorgenommenen Studien als zu hoch, da es im Zusammenhang mit den nicht unerheblichen Belastungen der Operation und der Narkose zu starken, teils letalen Nebenwirkungen kam.

Um auf molekularer Ebene die Konzentration der mRNA von IL-2 und MCP-1 zu erfassen [56] [57] [58] [61], wurde die Technik der RT-PCR verwandt. Hier zeigte sich,

dass trotz der Reduktion der Zellen kein signifikanter Unterschied sowohl von IL-2, als auch von MCP-1 zu erfassen war. Dies könnte bedeuten, dass auch eine verminderte Zahl an Zellen ausreichend sein kann, eine hohe Konzentration dieser Botenstoffe zu sezernieren. Parallel zu den hier gemachten Beobachtungen konnte Renkonen et al. [126] trotz einer drastischen Reduktion der infiltrierenden Zellen das Transplantatüberleben nicht verlängern. Eine mögliche Ursache kann sein, dass nicht die alleinige quantitative Reduktion der Zellen, sondern viel mehr ihr Aktivierungsgrad entscheidend für die Auslösung der Effektormechanismen ist.

4.3 Die Immunmodulation durch den Einsatz von STAT-1 und AP-1 Decoys

Als ein weiterer Ansatz war das Untersuchungsziel der zweiten Versuchsreihe, inwieweit man durch den Einsatz von ODN-Decoys zwei zentrale Transkriptionsfaktoren, AP-1 und STAT-1 inhibieren kann und damit die Antigenität des Transplantates herabgesetzt wird, so dass eine frühzeitige Transplantatprotektion erreicht wird.

Zur Inhibition der Transkriptionsfaktoren AP-1 und STAT-1 wurde die Decoy-Technologie verwandt [103] [105] [104], die bereits in mehreren Studien ihre Wirksamkeit bewiesen hat [134] [135] [136] [137] [138]. So konnte durch die hyperbare Perfusion mit ODN's die Expression des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 ohne toxische Nebenwirkungen unterdrückt werden [135] und in Kombination mit einem Antikörper gegen den Liganden des Adhäsionsmoleküls ICAM-1, LFA-1, konnte Langzeit-Transplantatüberleben über 60 Tage induziert werden [136]. In diesem Versuchsaufbau konnte allerdings trotz der hohen Transfektionsrate durch die ODN-Behandlung alleine keine Verzögerung der akuten Abstoßung und eine Verlängerung des Transplantatüberlebens erzielt werden. Im Gegensatz dazu konnte in einem Nierentransplantationsmodell durch die systemische Gabe von Lipofectin gebundenen ODN's das Transplantatüberleben von Iso-Transplantaten verlängert werden [134]. Hierbei handelt es sich allerdings um ein Modell zur Untersuchung des Ischämie- und Reperfusionsschadens.

In einer Studie zur Erforschung der akuten Abstoßung in einem Nierentransplantationsmodell konnte durch die Perfusion des Transplantates mit NF- κ B Decoys die Expression des Adhäsionsmoleküls VCAM-1 vermindert werden und dadurch die Infiltration mit Monozyten und Makrophagen vermindert werden [138]. Das

Transplantatüberleben konnte dadurch allerdings nicht verlängert werden. Auch in dieser Studie handelt es sich um verpackte, d. h. in Liposomen gebundene DNA, um die Aufnahme der Decoys in die Zellen zu erleichtern.

In dieser Studie wurden die Transplantate mit „nackten“ ODN's, das heißt ohne die Bindung an ein Transfektionsmolekül wie z.B. einem viralen Vektor oder Lipidverbindungen zusammen mit einer kardioplegen Lösung perfundiert. Dabei wurden die Decoys während der warmen Ischämiezeit von 45 Minuten aktiv von den Endothelzellen aufgenommen. Dies schließt mögliche Nebeneffekte, verursacht von Transfektionsmolekülen, aus und es kam zu einer Anreicherung der Decoys in den Zielzellen, den Endothelzellen der Transplantate. Damit handelt es sich nicht um eine systemische Immunsuppression, sondern vielmehr um einen Ansatz, die Antigenität des Transplantates durch den Eingriff in intrazelluläre Aktivierungsvorgänge zu vermindern. Dies sollte zu einer Reduktion der Immunantwort des Empfängers und dadurch zu einer Transplantatprotektion führen.

Es zeigte sich, dass die einmalige perioperative Gabe der Decoy-Lösungen in der Ischämiezeit des Herzens eine deutliche Verlängerung des Transplantatüberlebens bewirkte. Die Verlängerung der palpierbaren Transplantatfunktion betrug in beiden behandelten Gruppen ca. 33%. Dieser klinisch relevante Effekt konnte durch den Einsatz von in der Sequenz veränderten ODN-Strängen als Kontrolle auch eindeutig auf die spezifische Bindung der jeweiligen Decoys zurückgeführt werden.

Um die Decoys in den Transplantaten zu erfassen, wurden diese nach Fluoreszenzmarkierung in den perfundierten Organen nachgewiesen. Hier zeigte sich, dass es zu einer starken Anreicherung der Decoys im Endothel des Transplantates kam. In den weiteren Untersuchungen sollte geklärt werden, inwieweit die Inhibition der Transkriptionsfaktoren AP-1 und STAT-1 die Mechanismen der akuten Transplantat-abstoßung verändert. Hier zeigte sich, dass an den Tagen 1 und 3 *post transplantationem* das Adhäsionsmolekül ICAM-1 in beiden behandelten Gruppen im Vergleich zu den unbehandelten, akut abstoßenden Tieren stark vermindert exprimiert wurde. Beide Transkriptionsfaktoren werden mit der Induktion dieses zentralen Moleküls in Verbindung gebracht [37].

Das Adhäsionsmolekül VCAM-1 wurde durch die Decoy-Behandlung am ersten Tag postoperativ nahezu komplett inhibiert. Sowohl in der STAT-1- als auch in der AP-1-Gruppe zeigte sich eine minimale VCAM-1-Exprimierung, die der von nicht transplantierten Kontrollherzen entsprach. Dieser starke Effekt war allerdings am dritten

Tag nicht mehr nach-zuweisen.

Auch in dieser Studie war die Verminderung der Expression der Adhäsionsmoleküle auf Protein-Ebene, nicht aber auf mRNA-Ebene nachzuweisen, wobei man die Sensitivität der Methode in Bezug auf die rein endothelialen Prozesse in die Beurteilung einbeziehen muss. Gerade in der zweiten Versuchsreihe ist zu erwarten, dass es durch die exklusive endotheliale Aufnahme der Decoys auch überwiegend zur Beeinflussung der Endothelzellen kommt. Hierfür erscheint die RT-PCR aus dem Gesamtlisat nicht sensitiv genug zu sein.

Dieser hochgradige Schutz des Endothels vor der Expression der Adhäsionsmoleküle in der Frühphase spiegelte sich auch in der Anzahl der das Organ infiltrierenden Zellen wieder. So waren am Tag 3 die Zahl an MHC-II positiven, immunkompetenten Zellen in beiden Gruppen signifikant erniedrigt. Trotz der nur perioperativen Gabe der Decoys zeigte sich am Tag 3 in beiden Gruppen zusätzlich eine spezifische Reduktion der Anzahl an infiltrierenden T-Zellen und Monozyten/Makrophagen. Darüber hinaus war am Tag 6 nach Herztransplantation die Zahl der T-Zellen, die das Transplantat infiltrieren, in beiden Gruppen noch signifikant reduziert. Dies lässt einen spezifischen Einfluss dieser Behandlung auf die im Zentrum der akuten Abstoßung stehenden T-Lymphozyten vermuten.

Einen großen Unterschied zwischen den beiden behandelten Gruppen zeigte sich bei der Auswertung der Infiltration mit iNOS positiven Zellen. In den mit dem STAT-1 Decoy-behandelten Tieren reduzierte sich die Anzahl der iNOS positiven Zellen am Tag 3 hoch signifikant. Demgegenüber konnte durch die AP-1-Inhibition nur eine leichte Reduktion erzielt werden. Dies lässt vermuten, dass ein STAT-1-abhängiger Mechanismus zur reduzierten Infiltration der iNOS positiven Zellen führte. In der Promotorregion von iNOS finden sich Bindungsstellen für die IFN- γ -abhängigen Transkriptionsfaktoren IRF-1 und STAT-1 [139]. Für die endotheliale Expression von iNOS konnte dieser direkte Zusammenhang mit dem Cytokin IFN- γ und dem Transskriptionsfaktor STAT-1 festgestellt werden [34]. Dies könnte über einen positiven Feedback-Mechanismus auch Auswirkung auf die iNOS-Expression der das Transplantat infiltrierenden Zellen haben. Eine weitere mögliche Erklärung könnte sein, dass es während der Infiltration zur Aufnahme der Decoys kommt, die sich in und zwischen den Endothelzellen angereichert haben. So konnten in mehreren *In-vitro* und *In-vivo* Versuchen eine IFN- γ -abhängige iNOS-Exprimierung oder NO-Synthese bei Makrophagen nachgewiesen werden, die in einigen Studien auch nachgewiesener Weise direkt STAT-1-vermittelt ist

[140] [139] [141]. Der genaue Mechanismus der Beeinflussung der iNOS-Expression durch die Decoy-Behandlung muss allerdings noch untersucht werden.

Dass es am Tag 6 nicht bei allen Zellarten zu einer signifikanten Reduktion der Infiltration kam, liegt vermutlich an dem sehr stringenten akuten Abstoßungsmodell. Außerdem muss man bedenken, dass es sich bei der angestrebten Immunmodulation nicht um eine Immunsuppression handeln sollte. Vielmehr stand im Zentrum der Untersuchungen die Frage, inwieweit sich die Zugabe der Decoys zu einer kardioplegen Lösung positiv auf die Mechanismen der akuten Transplantatabstoßung im Sinne einer initialen Transplantatprotektion auswirken kann. Diese initiale Transplantatprotektion spielt eine große Rolle, da die Schäden des Transplantates in der Frühphase im Sinne der „Response to Injury“-Hypothese mitverantwortlich gemacht werden für die chronische Transplantatdysfunktion [142] [143].

Damit konnte zusammenfassend für eine Vielzahl von infiltrierenden Zellen, insbesondere der T-Zellen und Monozyten/Makrophagen, eine deutliche Reduktion der Infiltration der mit Decoy behandelten Transplantate nachgewiesen werden. Wie lässt sich diese Transplantatprotektion in der Frühphase der akuten Abstoßung erklären?

Wie wichtig die Kostimulation der T-Zellen ist, konnte schon früh gezeigt werden. Ohne dieses sog. zweite Signal verfällt die T-Zelle in den Zustand der Anergie, d.h., es kommt zu keiner Reaktion des Immunsystems [16] [17] [18] [19]. In der Transplantationsmedizin zeigte sich, dass es bereits während der Ischämie- und Reperfusionsphase zu einer Hochregulation der Kostimulationsmoleküle kommt und deren Blockade die Ischämie- und Reperfusionsschäden vermindern kann [144]. Im weiteren Verlauf der akuten Abstoßung kommt es weiterhin zur verstärkten Expression von CD40 [29]. Die Beeinflussung der Kostimulationsmoleküle bewies in mehreren Tierversuchen seine Wirksamkeit [23] [24]. So konnte in dem auch hier gewählten Transplantationsmodell durch die Blockade der Kostimulation über den CD28-B7-Weg durch die zusätzliche Gabe von Splenozyten Langzeitüberleben induziert werden [145]. Zusätzlich konnte durch einen direkten Antikörper gegen CD40 L, verbunden mit einer niedrig dosierten CsA-Gabe, bei 100% der Tiere ein Langzeitüberleben der Transplantate induziert werden [26].

Mittlerweile ist bekannt, dass es nicht nur im Zusammenspiel zweier Zellarten (cis-Kostimulation), sondern auch durch dritte Zellarten vermittelt zur vollständigen Aktivierung der T-Zellen kommen kann (trans-Kostimulation) [89] [27] siehe Einleitung). Daher könnte gerade die Inhibition des Kostimulationsmoleküls CD40 auf

den Endothelzellen, die als erstes mit den Blutzellen des Empfängers interagieren, einen starken Einfluss auf die Aktivität der infiltrierenden Zellen haben.

In der Studie konnte nachgewiesen werden, dass es zu einer Anreicherung der Decoys in den Endothelzellen des Transplantates kommt. Zusätzlich ist von beiden Transkriptionsfaktoren aus *In-vitro*-Versuchen mit Ratten-Endothelzellen bekannt, dass sie die CD40-Expression beeinflussen. So ist AP-1 für die basale Expression (Stadlbauer et al., eingereicht) und STAT-1 für die Hochregulation [34] dieses Kostimulationsmoleküls verantwortlich. Dies könnte evtl. erklären, warum beide Gruppen in vielen Effekten konform gehen.

Damit liegt die Vermutung nahe, dass es in der *In-vivo*-Studie zu einer Reduktion dieses zentralen Kostimulationsmoleküls auf der Oberfläche des Gefäßendothels kam. Damit wäre die *trans*-Kostimulation über die Endothelzellen gehemmt und die Aktivierung der infiltrierenden Zellen sollte vermindert worden sein.

Dies könnte auch erklären, dass bei den Hauptzielzellen der CD40-Stimulation, den T-Zellen, die reduzierte Infiltration bis zum Tag 6 nachzuweisen war. Auch für die Expression des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 gilt die CD40-Ligation als ein Hauptstimulus [146].

4.4 Ausblick

Um die hier gezeigten positiven Effekte der beiden unterschiedlichen Strategien der Transplantatprotektion genauer einordnen zu können, sind weitere Untersuchungen erforderlich. So sollte zum einen der Weg der Induktion der gesteigerten Apoptoserate während des Abstoßungsprozesses genauer untersucht werden. Zur Absicherung der Wirkungsweise der Decoys müsste der Brückenschluss zwischen den vorhandenen *In-vitro*- und den *In-vivo*-Daten geschlossen werden. Hierfür bedarf es eines sehr spezifischen Verfahrens, dem Laser gestützten Cell-Picking. Damit könnte man die mRNA-Konzentration von CD40 direkt in den Endothelzellen bestimmen. Dies sollte aufgrund der viel versprechenden Ergebnisse in Folgestudien erfolgen. Des Weiteren sollte die Auswirkung dieses initialen Transplantatschutzes auf die chronische Form, die Ausprägung der Transplantatvasculopathie, weiter erforscht werden. Hier scheint es von besonderem Interesse, ob durch den Fröhschutz des Organs die Dosis des immer noch weitestgehend üblichen CsA's reduziert werden könnte. Damit könnten die Nebenwirkungen dieses Immunsuppressivums, wie die Nephrotoxizität, minimiert werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in beiden Studien durch zwei unterschiedliche Strategien die Mechanismen der akuten Transplantatabstoßung positiv im Sinne einer initialen Transplantatprotektion beeinflusst wurden. Trotz der nur einmaligen peri-operativen Gabe in der kardioplegen Lösung war die spezifische Inhibition der Transkriptionsfaktoren durch die Decoy-Technologie der systemischen Gabe des Immunmodulators c3Ado überlegen. Dies beruht vermutlich zum einen auf dem direkten Ziel der Aktivierung der T-Zellen und zum anderen auf der noch frühzeitigeren Beeinflussung der akuten Abstoßung. Damit zeigt sich, wie wichtig das tief greifende Verständnis pathologischer Prozesse für die Suche nach optimalen Therapieformen ist. Je weiter die Kenntnisse der Mechanismen reichen, umso gezielter kann in intrazelluläre Prozesse eingegriffen werden und umso effektivere Therapieformen können entwickelt werden.

Literaturverzeichnis

1. Cooper, D.K., *Christiaan Barnard and his contributions to heart transplantation*. J Heart Lung Transplant, 2001. **20**(6): p. 599-610.
2. Taylor, D.O., L.B. Edwards, M.M. Boucek, E.P. Trulock, B.M. Keck, and M.I. Hertz, *The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: twenty-first official adult heart transplant report--2004*. J Heart Lung Transplant, 2004. **23**(7): p. 796-803.
3. Deng, M.C., J.M. De Meester, J.M. Smits, J. Heinecke, and H.H. Scheld, *Effect of receiving a heart transplant: analysis of a national cohort entered on to a waiting list, stratified by heart failure severity. Comparative Outcome and Clinical Profiles in Transplantation (COC PIT) Study Group*. Bmj, 2000. **321**(7260): p. 540-5.
4. Hertz, M.I., D.O. Taylor, E.P. Trulock, M.M. Boucek, P.J. Mohacsi, L.B. Edwards, and B.M. Keck, *The registry of the international society for heart and lung transplantation: nineteenth official report-2002*. J, Heart Lung Transplant 2002 Sep. **21**(9): p. 950-70.
5. Weis, M. and W. von Scheidt, *Cardiac allograft vasculopathy: a review*. Circulation, 1997. **96**(6): p. 2069-77.
6. Uretsky, B.F., S. Murali, P.S. Reddy, B. Rabin, A. Lee, B.P. Griffith, R.L. Hardesty, A. Trento, and H.T. Bahnson, *Development of coronary artery disease in cardiac transplant patients receiving immunosuppressive therapy with cyclosporine and prednisone*. Circulation, 1987. **76**(4): p. 827-34.
7. Billingham, M.E., *Pathology and etiology of chronic rejection of the heart*. Clin Transplant, 1994. **8**(3 Pt 2): p. 289-92.
8. Kobashigawa, J.A., L. Miller, A. Yeung, P. Hauptman, H. Ventura, R. Wilensky, H. Valentine, and J. Wiedermann, *Does acute rejection correlate with the development of transplant coronary artery disease? A multicenter study using intravascular ultrasound. Sandoz/CVIS Investigators*. J Heart Lung Transplant, 1995. **14**(6 Pt 2): p. S221-6.
9. Reed, E.F., B. Hong, E. Ho, P.E. Harris, J. Weinberger, and N. Suciu-Foca, *Monitoring of soluble HLA alloantigens and anti-HLA antibodies identifies heart allograft recipients at risk of transplant-associated coronary artery disease*. Transplantation, 1996. **61**(4): p. 566-72.
10. Fellstrom, B., U. Backman, E. Larsson, and L. Zezina, *Immunologic and nonimmunologic risk factors of chronic rejection*. Transplant Proc, 1999. **31**(1-2): p. 1304-5.
11. Barry, W.H., *Mechanisms of immune-mediated myocyte injury*. Circulation, 1994. **89**(5): p. 2421-32.
12. Pattison, J.M. and A.M. Krensky, *New insights into mechanisms of allograft rejection*. Am J Med Sci, 1997. **313**(5): p. 257-63.
13. Brodsky, F.M. and L.E. Guagliardi, *The cell biology of antigen processing and presentation*. Annu Rev Immunol, 1991. **9**: p. 707-44.
14. Malnati, M.S., M. Marti, T. LaVaute, D. Jaraquemada, W. Biddison, R. DeMars, and E.O. Long, *Processing pathways for presentation of cytosolic antigen to MHC class II-restricted T cells*. Nature, 1992. **357**(6380): p. 702-4.

15. Gould, D.S. and H. Auchincloss, Jr., *Direct and indirect recognition: the role of MHC antigens in graft rejection*. Immunol Today, 1999. **20**(2): p. 77-82.
16. Schwartz, R.H., *A cell culture model for T lymphocyte clonal anergy*. Science, 1990. **248**(4961): p. 1349-56.
17. Liu, Y. and P.S. Linsley, *Costimulation of T-cell growth*. Curr Opin Immunol, 1992. **4**(3): p. 265-70.
18. Schwartz, R.H., *T cell clonal anergy*. Curr Opin Immunol, 1997. **9**(3): p. 351-7.
19. Larsen, C.P. and T.C. Pearson, *The CD40 pathway in allograft rejection, acceptance, and tolerance*. Curr Opin Immunol, 1997. **9**(5): p. 641-7.
20. Banchereau, J., F. Bazan, D. Blanchard, F. Briere, J.P. Galizzi, C. van Kooten, Y.J. Liu, F. Rousset, and S. Saeland, *The CD40 antigen and its ligand*. Annu Rev Immunol, 1994. **12**: p. 881-922.
21. Denton, M.D., R.M. Reul, V.R. Dharnidharka, J.C. Fang, P. Ganz, and D.M. Briscoe, *Central role for CD40/CD40 ligand (CD154) interactions in transplant rejection*. Pediatr Transplant, 1998. **2**(1): p. 6-15.
22. Larsen, C.P., E.T. Elwood, D.Z. Alexander, S.C. Ritchie, R. Hendrix, C. Tucker-Burden, H.R. Cho, A. Aruffo, D. Hollenbaugh, P.S. Linsley, K.J. Winn, and T.C. Pearson, *Long-term acceptance of skin and cardiac allografts after blocking CD40 and CD28 pathways*. Nature, 1996. **381**(6581): p. 434-8.
23. Lu, L., W. Li, F. Fu, F.G. Chambers, S. Qian, J.J. Fung, and A.W. Thomson, *Blockade of the CD40-CD40 ligand pathway potentiates the capacity of donor-derived dendritic cell progenitors to induce long-term cardiac allograft survival*. Transplantation, 1997. **64**(12): p. 1808-15.
24. Kirk, A.D., D.M. Harlan, N.N. Armstrong, T.A. Davis, Y. Dong, G.S. Gray, X. Hong, D. Thomas, J.H. Fechner, Jr., and S.J. Knechtle, *CTLA4-Ig and anti-CD40 ligand prevent renal allograft rejection in primates*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(16): p. 8789-94.
25. Schaub, M., T. Stadlbauer, A. Chandraker, J. Vella, L. Turka, and M. Sayegh, *Comparative strategies to induce long-term graft acceptance in fully allogeneic renal versus cardiac allograft models by CD28-B7 T cell costimulatory blockade: role of thymus and spleen*. J Am Soc Nephrol, 1998. **9**(5): p. 891-898.
26. Yuan, X., V.M. Dong, A.J. Coito, A.M. Waaga, A.D. Salama, C.D. Benjamin, M.H. Sayegh, and A. Chandraker, *A novel CD154 monoclonal antibody in acute and chronic rat vascularized cardiac allograft rejection*. Transplantation, 2002. **73**(11): p. 1736-42.
27. Mandelbrot, D.A., K. Kishimoto, H. Auchincloss, Jr., A.H. Sharpe, and M.H. Sayegh, *Rejection of mouse cardiac allografts by costimulation in trans*. J Immunol, 2001. **167**(3): p. 1174-8.
28. Karmann, K., C.C. Hughes, J. Schechner, W.C. Fanslow, and J.S. Pober, *CD40 on human endothelial cells: inducibility by cytokines and functional regulation of adhesion molecule expression*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(10): p. 4342-6.
29. Reul, R.M., J.C. Fang, M.D. Denton, C. Geehan, C. Long, R.N. Mitchell, P. Ganz, and D.M. Briscoe, *CD40 and CD40 ligand (CD154) are coexpressed on microvessels in vivo in human cardiac allograft rejection*. Transplantation, 1997. **64**(12): p. 1765-74.

30. Crabtree, G.R. and N.A. Clipstone, *Signal Transmission Between the Plasma Membrane and Nucleus of T Lymphocytes*. Annual Review of Biochemistry, 1994. **63**(1): p. 1045-1083.
31. Schindler, C. and J.E. Darnell, *Transcriptional Responses to Polypeptide Ligands: The JAK-STAT Pathway*. Annual Review of Biochemistry, 1995. **64**(1): p. 621-652.
32. Morikawa, M., R.A. Shorthouse, M.J. Suto, M.E. Goldman, and R.E. Morris, *A novel inhibitor of nuclear factor-kappa B and activator protein-1 transcription factors in T cells suppresses host-versus-graft alloreactivity in vivo*. Transplant Proc, 1997. **29**(1-2): p. 1269-70.
33. Torgerson, T.R., A.D. Colosia, J.P. Donahue, Y.-Z. Lin, and J. Hawiger, *Regulation of NF- κ B, AP-1, NFAT, and STAT1 Nuclear Import in T Lymphocytes by Noninvasive Delivery of Peptide Carrying the Nuclear Localization Sequence of NF- κ B p50*. J Immunol, 1998. **161**(11): p. 6084-6092.
34. Wagner, A.H., M. Gebauer, B. Pollok-Kopp, and M. Hecker, *Cytokine-inducible CD40 expression in human endothelial cells is mediated by interferon regulatory factor-1*. Blood, 2002. **99**(2): p. 520-5.
35. Darnell, J.E., Jr., *STATs and gene regulation*. Science, 1997. **277**(5332): p. 1630-5.
36. Leonard, W.J. and J.J. O'Shea, *Jaks and STATs: biological implications*. Annu Rev Immunol, 1998. **16**: p. 293-322.
37. Roebuck, K.A. and A. Finnegan, *Regulation of intercellular adhesion molecule-1 (CD54) gene expression*. J Leukoc Biol, 1999. **66**(6): p. 876-88.
38. Muhlethaler-Mottet, A., W. Di Berardino, L.A. Otten, and B. Mach, *Activation of the MHC class II transactivator CIITA by interferon-gamma requires cooperative interaction between Stat1 and USF-1*. Immunity, 1998. **8**(2): p. 157-66.
39. Mascareno, E., M. El-Shafei, N. Maulik, M. Sato, Y. Guo, D.K. Das, and M.A. Siddiqui, *JAK/STAT signaling is associated with cardiac dysfunction during ischemia and reperfusion*. Circulation, 2001. **104**(3): p. 325-9.
40. Stephanou, A., T.M. Scarabelli, B.K. Brar, Y. Nakanishi, M. Matsumura, R.A. Knight, and D.S. Latchman, *Induction of Apoptosis and Fas Receptor/Fas Ligand Expression by Ischemia/Reperfusion in Cardiac Myocytes Requires Serine 727 of the STAT-1 Transcription Factor but Not Tyrosine 701*. J. Biol. Chem., 2001. **276**(30): p. 28340-28347.
41. Stephanou, A., T.M. Scarabelli, P.A. Townsend, R. Bell, D. Yellon, R.A. Knight, and D.S. Latchman, *The carboxyl-terminal activation domain of the STAT-1 transcription factor enhances ischemia/reperfusion-induced apoptosis in cardiac myocytes*. Faseb J, 2002. **16**(13): p. 1841-3.
42. Karin, M., Z. Liu, and E. Zandi, *AP-1 function and regulation*. Curr Opin Cell Biol, 1997. **9**(2): p. 240-6.
43. Zwacka, R.M., Y. Zhang, W. Zhou, J. Halldorson, and J.F. Engelhardt, *Ischemia/reperfusion injury in the liver of BALB/c mice activates AP-1 and nuclear factor kappaB independently of IkappaB degradation*. Hepatology, 1998. **28**(4): p. 1022-30.
44. Sun, B., H. Fan, T. Honda, R. Fujimaki, A. Lafond-Walker, Y. Masui, C.J. Lowenstein, and L.C. Becker, *Activation of NF kappa B and expression of ICAM-1 in ischemic-reperfused canine myocardium*. J Mol Cell Cardiol, 2001. **33**(1): p. 109-19.

45. Palmer, H.J. and K.E. Paulson, *Reactive oxygen species and antioxidants in signal transduction and gene expression*. Nutr Rev, 1997. **55**(10): p. 353-61.
46. Macian, F., C. Garcia-Rodriguez, and A. Rao, *Gene expression elicited by NFAT in the presence or absence of cooperative recruitment of Fos and Jun*. Embo J, 2000. **19**(17): p. 4783-95.
47. Fields, P.E., T.F. Gajewski, and F.W. Fitch, *Blocked Ras activation in anergic CD4+ T cells*. Science, 1996. **271**(5253): p. 1276-8.
48. Gearing, A.J. and W. Newman, *Circulating adhesion molecules in disease*. Immunol Today, 1993. **14**(10): p. 506-12.
49. Bevilacqua, M.P. and R.M. Nelson, *Endothelial-leukocyte adhesion molecules in inflammation and metastasis*. Thromb Haemost, 1993. **70**(1): p. 152-4.
50. Bevilacqua, M.P. and R.M. Nelson, *Selectins*. J Clin Invest, 1993. **91**(2): p. 379-87.
51. Carlos, T.M. and J.M. Harlan, *Leukocyte-endothelial adhesion molecules*. Blood, 1994. **84**(7): p. 2068-101.
52. Kaplanski, G., V. Marin, M. Fabrigoule, V. Boulay, A.M. Benoliel, P. Bongrand, S. Kaplanski, and C. Farnarier, *Thrombin-activated human endothelial cells support monocyte adhesion in vitro following expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1; CD54) and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1; CD106)*. Blood, 1998. **92**(4): p. 1259-67.
53. Heemann, U.W., S.G. Tullius, H. Azuma, J. Kupiec-Weglinsky, and N.L. Tilney, *Adhesion molecules and transplantation*. Ann Surg, 1994. **219**(1): p. 4-12.
54. Orosz, C.G., R.G. Ohye, R.P. Pelletier, A.M. Van Buskirk, E. Huang, C. Morgan, P.W. Kincade, and R.M. Ferguson, *Treatment with anti-vascular cell adhesion molecule 1 monoclonal antibody induces long-term murine cardiac allograft acceptance*. Transplantation, 1993. **56**(2): p. 453-60.
55. Simonson, M.S., A.V. Robinson, J.A. Schulak, and D.E. Hricik, *Inhibition of endothelin-1 improves survival and vasculopathy in rat cardiac transplants treated with cyclosporine*. Transplantation, 2002. **73**(7): p. 1054-9.
56. Bugeon, L., M.C. Cuturi, M.M. Hallet, J. Paineau, D. Chabannes, and J.P. Souillou, *Peripheral tolerance of an allograft in adult rats--characterization by low interleukin-2 and interferon-gamma mRNA levels and by strong accumulation of major histocompatibility complex transcripts in the graft*. Transplantation, 1992. **54**(2): p. 219-25.
57. Dallman, M.J., *Cytokines as mediators of organ graft rejection and tolerance*. Curr Opin Immunol, 1993. **5**(5): p. 788-93.
58. Josien, R., C. Pannetier, P. Douillard, D. Cantarovich, S. Menoret, L. Bugeon, P. Kourilsky, J.P. Souillou, and M.C. Cuturi, *Graft-infiltrating T helper cells, CD45RC phenotype, and Th1/Th2-related cytokines in donor-specific transfusion-induced tolerance in adult rats*. Transplantation, 1995. **60**(10): p. 1131-9.
59. Tanaka, K., W. Hancock, H. Osawa, K. Stunkel, T. Alberghini, T. Diamantstein, N. Tilney, and J. Kupiec-Weglinski, *Mechanism of action of anti-IL-2R monoclonal antibodies. ART-18 prolongs cardiac allograft survival in rats by elimination of IL-2R+ mononuclear cells*. J Immunol, 1989. **143**(9): p. 2873-2879.

60. Sano, I., T. Takahashi, T. Koji, H. Udonon, K. Yui, and H. Ayabe, *Prolonged survival of rat cardiac allograft with proinflammatory cytokine inhibitor*. J Heart Lung Transplant, 2001. **20**(5): p. 583-9.
61. Waldmann, T.A. and J. O'Shea, *The use of antibodies against the IL-2 receptor in transplantation*. Curr Opin Immunol, 1998. **10**(5): p. 507-12.
62. Kasama, T., R.M. Strieter, T.J. Standiford, M.D. Burdick, and S.L. Kunkel, *Expression and regulation of human neutrophil-derived macrophage inflammatory protein 1 alpha*. J Exp Med, 1993. **178**(1): p. 63-72.
63. Mason, D.W. and P.J. Morris, *Effector mechanisms in allograft rejection*. Annu Rev Immunol, 1986. **4**: p. 119-45.
64. Clement, M.V., S. Legros-Maida, D. Israel-Biet, F. Carnot, A. Soulie, P. Reynaud, J. Guillet, I. Gandjbakch, and M. Sasportes, *Perforin and granzyme B expression is associated with severe acute rejection. Evidence for in situ localization in alveolar lymphocytes of lung-transplanted patients*. Transplantation, 1994. **57**(3): p. 322-6.
65. Lipman, M.L., A.C. Stevens, and T.B. Strom, *Heightened intragraft CTL gene expression in acutely rejecting renal allografts*. J Immunol, 1994. **152**(10): p. 5120-7.
66. Berke, G., *The CTL's kiss of death*. Cell, 1995. **81**(1): p. 9-12.
67. Hockenbery, D., *Defining apoptosis*. Am J Pathol, 1995. **146**(1): p. 16-9.
68. Majno, G. and I. Joris, *Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death*. Am J Pathol, 1995. **146**(1): p. 3-15.
69. White, E., *Life, death, and the pursuit of apoptosis*. Genes Dev, 1996. **10**(1): p. 1-15.
70. Szabolcs, M., R.E. Michler, X. Yang, W. Aji, D. Roy, E. Athan, R.R. Sciacca, O.P. Minanov, and P.J. Cannon, *Apoptosis of cardiac myocytes during cardiac allograft rejection. Relation to induction of nitric oxide synthase*. Circulation, 1996. **94**(7): p. 1665-73.
71. Szabolcs, M.J., S. Ravalli, O. Minanov, R.R. Sciacca, R.E. Michler, and P.J. Cannon, *Apoptosis and increased expression of inducible nitric oxide synthase in human allograft rejection*. Transplantation, 1998. **65**(6): p. 804-12.
72. Koglin, J. and M.E. Russell, *Alloimmune-mediated apoptosis: comparison in mouse models of acute and chronic cardiac rejection*. Transplantation, 1999. **67**(6): p. 904-9.
73. Gauthier, T.W., K.L. Davenpeck, and A.M. Lefer, *Nitric oxide attenuates leukocyte-endothelial interaction via P-selectin in splanchnic ischemia-reperfusion*. Am J Physiol, 1994. **267**(4 Pt 1): p. G562-8.
74. Liu, P., K. Yin, R. Nagele, and P.Y. Wong, *Inhibition of nitric oxide synthase attenuates peroxynitrite generation, but augments neutrophil accumulation in hepatic ischemia-reperfusion in rats*. J Pharmacol Exp Ther, 1998. **284**(3): p. 1139-46.
75. Cannon, P., X. Yang, M.J. Szabolcs, S. Ravalli, R.R. Sciacca, and R.E. Michler, *The role of inducible nitric oxide synthase in cardiac allograft rejection*. Cardiovasc Res, 1998. **38**(1): p. 6-15.
76. Ono, K. and E.S. Lindsey, *Improved technique of heart transplantation in rats*. J Thorac Cardiovasc Surg, 1969. **57**(2): p. 225-9.

77. Asfour, B., J.M. Hare, T. Kohl, H.A. Baba, D.A. Kass, K. Chen, T.D. Tjan, D. Hammel, M. Weyand, R.H. Hruban, H.H. Scheld, and B.J. Byrne, *A simple new model of physiologically working heterotopic rat heart transplantation provides hemodynamic performance equivalent to that of an orthotopic heart*. J Heart Lung Transplant, 1999. **18**(10): p. 927-36.
78. Borel, J.F., C. Feurer, H.U. Gubler, and H. Stahelin, *Biological effects of cyclosporin A: a new antilymphocytic agent*. Agents Actions, 1976. **6**(4): p. 468-75.
79. Calne, R.Y., D.J. White, S. Thiru, D.B. Evans, P. McMaster, D.C. Dunn, G.N. Craddock, B.D. Pentlow, and K. Rolles, *Cyclosporin A in patients receiving renal allografts from cadaver donors*. Lancet, 1978. **2**(8104-5): p. 1323-7.
80. Perico, N. and G. Remuzzi, *Prevention of transplant rejection: current treatment guidelines and future developments*. Drugs, 1997. **54**(4): p. 533-70.
81. Bush, W.W., *Overview of transplantation immunology and the pharmacotherapy of adult solid organ transplant recipients: focus on immunosuppression*. AACN Clin Issues, 1999. **10**(2): p. 253-69; quiz 304-6.
82. Schwartz, R. and W. Dameshek, *Drug-induced immunological tolerance*. Nature, 1959. **183**(4676): p. 1682-3.
83. Kobashigawa, J.A., J.K. Kirklin, D.C. Naftel, R.C. Bourge, H.O. Ventura, P.K. Mohanty, G.B. Cintron, and G. Bhat, *Pretransplantation risk factors for acute rejection after heart transplantation: a multiinstitutional study*. The Transplant Cardiologists Research Database Group. J Heart Lung Transplant, 1993. **12**(3): p. 355-66.
84. Hauptman, P.J., T. Nakagawa, H. Tanaka, and P. Libby, *Acute rejection: culprit or coincidence in the pathogenesis of cardiac graft vascular disease?* J Heart Lung Transplant, 1995. **14**(6 Pt 2): p. S173-80.
85. Costanzo, M.R., D.C. Naftel, M.R. Pritzker, J.K. Heilman, 3rd, J.P. Boehmer, S.C. Brozena, G.W. Dec, H.O. Ventura, J.K. Kirklin, R.C. Bourge, and L.W. Miller, *Heart transplant coronary artery disease detected by coronary angiography: a multiinstitutional study of preoperative donor and recipient risk factors*. Cardiac Transplant Research Database. J Heart Lung Transplant, 1998. **17**(8): p. 744-53.
86. Meiser, B.M., P. Uberfuhr, A. Fuchs, D. Schmidt, M. Pfeiffer, D. Paulus, C. Schulze, S. Wildhirt, W.V. Scheidt, C. Angermann, V. Klauss, S. Martin, H. Reichenspurner, E. Kreuzer, and B. Reichart, *Single-center randomized trial comparing tacrolimus (FK506) and cyclosporine in the prevention of acute myocardial rejection*. J Heart Lung Transplant, 1998. **17**(8): p. 782-8.
87. Meiser, B.M., M. Pfeiffer, D. Schmidt, H. Reichenspurner, P. Ueberfuhr, D. Paulus, W. von Scheidt, E. Kreuzer, D. Seidel, and B. Reichart, *Combination therapy with tacrolimus and mycophenolate mofetil following cardiac transplantation: importance of mycophenolic acid therapeutic drug monitoring*. J Heart Lung Transplant, 1999. **18**(2): p. 143-9.

88. Reichart, B., B. Meiser, M. Vigano, M. Rinaldi, L. Martinelli, M. Yacoub, N.R. Banner, I. Gandjbakhch, R. Dorent, R. Hetzer, and M. Hummel, *European Multicenter Tacrolimus (FK506) Heart Pilot Study: one-year results--European Tacrolimus Multicenter Heart Study Group*. J Heart Lung Transplant, 1998. **17**(8): p. 775-81.
89. Denton, M.D., S.F. Davis, M.A. Baum, M. Melter, M.E. Reinders, A. Exeni, D.V. Samsonov, J. Fang, P. Ganz, and D.M. Briscoe, *The role of the graft endothelium in transplant rejection: evidence that endothelial activation may serve as a clinical marker for the development of chronic rejection*. Pediatr Transplant, 2000. **4**(4): p. 252-60.
90. Cosimi, A.B., D. Conti, F.L. Delmonico, F.I. Pfeffer, S.L. Wee, R. Rothlein, R. Faanes, and R.B. Colvin, *In vivo effects of monoclonal antibody to ICAM-1 (CD54) in nonhuman primates with renal allografts*. J Immunol, 1990. **144**(12): p. 4604-12.
91. Nakakura, E.K., S.M. McCabe, B. Zheng, R.A. Shorthouse, T.M. Scheiner, G. Blank, P.M. Jardieu, and R.E. Morris, *Potent and effective prolongation by anti-LFA-1 monoclonal antibody monotherapy of non-primarily vascularized heart allograft survival in mice without T cell depletion*. Transplantation, 1993. **55**(2): p. 412-7.
92. Kameoka, H., M. Ishibashi, T. Tamatani, Y. Takano, A. Moutabarrik, H. Jiang, Y. Kokado, S. Takahara, A. Okuyama, T. Kinoshita, and et al., *The immunosuppressive action of anti-CD18 monoclonal antibody in rat heterotopic heart allotransplantation*. Transplantation, 1993. **55**(3): p. 665-7.
93. Sadahiro, M., T.O. McDonald, and M.D. Allen, *Reduction in cellular and vascular rejection by blocking leukocyte adhesion molecule receptors*. Am J Pathol, 1993. **142**(3): p. 675-83.
94. Paulsen, M. and A.C. Ferguson-Smith, *DNA methylation in genomic imprinting, development, and disease*. J Pathol, 2001. **195**(1): p. 97-110.
95. Jurgensen, C.H., B.E. Huber, T.P. Zimmerman, and G. Wolberg, *3-deazaadenosine inhibits leukocyte adhesion and ICAM-1 biosynthesis in tumor necrosis factor-stimulated human endothelial cells*. J Immunol, 1990. **144**(2): p. 653-61.
96. Aksamit, R.R., W. Falk, and G.L. Cantoni, *Inhibition of chemotaxis by S-3-deazaadenosylhomocysteine in a mouse macrophage cell line*. J Biol Chem, 1982. **257**(2): p. 621-5.
97. Jeong, S.Y., J.H. Lee, H.S. Kim, S.H. Hong, C.H. Cheong, and I.K. Kim, *3-Deazaadenosine analogues inhibit the production of tumour necrosis factor-alpha in RAW264.7 cells stimulated with lipopolysaccharide*. Immunology, 1996. **89**(4): p. 558-62.
98. Pike, M.C. and R. Snyderman, *Transmethylation reactions regulate affinity and functional activity of chemotactic factor receptors on macrophages*. Cell, 1982. **28**(1): p. 107-14.
99. Pike, L.J., A.T. Eakes, and E.G. Krebs, *Characterization of affinity-purified insulin receptor/kinase. Effects of dithiothreitol on receptor/kinase function*. J Biol Chem, 1986. **261**(8): p. 3782-9.
100. Walker, G., A.C. Langheinrich, E. Dennhauser, R.M. Bohle, T. Dreyer, J. Kreuzer, H. Tillmanns, R.C. Braun-Dullaues, and W. Haberbosch, *3-deazaadenosine prevents adhesion molecule expression and atherosclerotic lesion formation in the aortas of C57BL/6J mice*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1999. **19**(11): p. 2673-9.

101. Braun-Dullaeus, R.C., S. Dietrich, M.J. Schoaff, D.G. Sedding, B. Leithaeuser, G. Walker, U. Seay, R.F. Matthias, W. Kummer, H. Tillmanns, and W. Haberbosch, *Protective effect of 3-deazaadenosine in a rat model of lipopolysaccharide-induced myocardial dysfunction*. Shock, 2003. **19**(3): p. 245-51.
102. Chiang, C.H., C.P. Wu, W.C. Perng, H.C. Yan, and C.P. Yu, *Use of anti-(tumour necrosis factor-alpha) antibody or 3-deaza-adenosine as additives to promote protection by University of Wisconsin solution in ischaemia/reperfusion injury*. Clin, Sci (Colch) 2000 Sep. **99**(3): p. 215-22.
103. Cho-Chung, Y.S., Y.G. Park, and Y.N. Lee, *Oligonucleotides as transcription factor decoys*. Curr Opin Mol Ther, 1999. **1**(3): p. 386-92.
104. Tomita, N., H. Azuma, Y. Kaneda, T. Ogihara, and R. Morishita, *Gene therapy with transcription factor decoy oligonucleotides as a potential treatment for cardiovascular diseases*. Curr Drug Targets, 2003. **4**(4): p. 339-46.
105. Tomita, N., T. Ogihara, and R. Morishita, *Transcription factors as molecular targets: molecular mechanisms of decoy ODN and their design*. Curr Drug Targets, 2003. **4**(8): p. 603-8.
106. Yamasaki, K., T. Asai, M. Shimizu, M. Aoki, N. Hashiya, H. Sakonjo, H. Makino, Y. Kaneda, T. Ogihara, and R. Morishita, *Inhibition of NFkappaB activation using cis-element 'decoy' of NFkappaB binding site reduces neointimal formation in porcine balloon-injured coronary artery model*. Gene Ther, 2003. **10**(4): p. 356-64.
107. Feeley, B.T., D.N. Miniati, A.K. Park, E.G. Hoyt, and R.C. Robbins, *Nuclear factor-kappaB transcription factor decoy treatment inhibits graft coronary artery disease after cardiac transplantation in rodents*. Transplantation, 2000. **70**(11): p. 1560-8.
108. Taal, M.W., K. Zandi-Nejad, B. Weening, A. Shahsafaei, S. Kato, K.W. Lee, F. Ziai, T. Jiang, B.M. Brenner, and H.S. MacKenzie, *Proinflammatory gene expression and macrophage recruitment in the rat remnant kidney*. Kidney Int, 2000. **58**(4): p. 1664-76.
109. Segel, L.D., D.W. vonHaag, J. Zhang, and D.M. Follette, *Selective overexpression of inflammatory molecules in hearts from brain-dead rats*. J Heart Lung Transplant, 2002. **21**(7): p. 804-11.
110. Grandel, U., L. Fink, A. Blum, M. Heep, M. Buerke, H.J. Kraemer, K. Mayer, R.M. Bohle, W. Seeger, F. Grimminger, and U. Sibelius, *Endotoxin-induced myocardial tumor necrosis factor-alpha synthesis depresses contractility of isolated rat hearts: evidence for a role of sphingosine and cyclooxygenase-2-derived thromboxane production*. Circulation, 2000. **102**(22): p. 2758-64.
111. Schmid, C., J. Binder, U. Heemann, and N.L. Tilney, *Successful heterotopic heart transplantation in rat*. Microsurgery, 1994. **15**(4): p. 279-81.
112. Schmid, C., U. Heemann, H. Azuma, and N.L. Tilney, *Rapamycin inhibits transplant vasculopathy in long-surviving rat heart allografts*. Transplantation, 1995. **60**(7): p. 729-33.
113. Wagner, A.H., R. Krzesz, D. Gao, C. Schroeder, M. Cattaruzza, and M. Hecker, *Decoy oligodeoxynucleotide characterization of transcription factors controlling endothelin-B receptor expression in vascular smooth muscle cells*. Mol, Pharmacol 2000 Dec. **58**(6): p. 1333-40.

114. Chomczynski, P. and N. Sacchi, *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. Anal Biochem, 1987. **162**(1): p. 156-9.
115. Mullis, K., F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn, and H. Erlich, *Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction*. 1986. Biotechnology, 1992. **24**: p. 17-27.
116. Jorgensen, P.E., E.J. Erlandsen, S.S. Poulsen, S. Markussen, C. Koch, and A. Brock, *Activity and immunohistochemical localization of porphobilinogen deaminase in rat tissues*. Scand J Clin Lab Invest, 2000. **60**(7): p. 635-41.
117. Fink, L., W. Seeger, L. Ermert, J. Hanze, U. Stahl, F. Grimminger, W. Kummer, and R.M. Bohle, *Real-time quantitative RT-PCR after laser-assisted cell picking*. Nat Med, 1998. **4**(11): p. 1329-33.
118. Finke, J., R. Fritzen, P. Ternes, W. Lange, and G. Dolken, *An improved strategy and a useful housekeeping gene for RNA analysis from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues by PCR*. Biotechniques, 1993. **14**(3): p. 448-53.
119. Menon, R.S., Y.F. Chang, J. St Clair, and R.G. Ham, *RT-PCR artifacts from processed pseudogenes*. PCR Methods Appl, 1991. **1**(1): p. 70-1.
120. Schmidt, J.A., R. Bomford, X.M. Gao, and J. Rhodes, *3-Deazaadenosine--an inhibitor of interleukin 1 production by human peripheral blood monocytes*. Int J Immunopharmacol, 1990. **12**(1): p. 89-97.
121. Tilney, N.L. and J.W. Kupiec-Weglinski, *The biology of acute transplant rejection*. Ann Surg, 1991. **214**(2): p. 98-106.
122. Strehlau, J., M. Pavlakis, M. Lipman, M. Shapiro, L. Vasconcellos, W. Harmon, and T.B. Strom, *Quantitative detection of immune activation transcripts as a diagnostic tool in kidney transplantation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(2): p. 695-700.
123. Billingham, M.E., N.R. Cary, M.E. Hammond, J. Kemnitz, C. Marboe, H.A. McCallister, D.C. Snovar, G.L. Winters, and A. Zerbe, *A working formulation for the standardization of nomenclature in the diagnosis of heart and lung rejection: Heart Rejection Study Group. The International Society for Heart Transplantation*. J Heart Transplant, 1990. **9**(6): p. 587-93.
124. Grace, P.A., *Ischaemia-reperfusion injury*. Br J Surg, 1994. **81**(5): p. 637-47.
125. Nakakura, E.K., R.A. Shorthouse, B. Zheng, S.M. McCabe, P.M. Jardieu, and R.E. Morris, *Long-term survival of solid organ allografts by brief anti-lymphocyte function-associated antigen-1 monoclonal antibody monotherapy*. Transplantation, 1996. **62**(5): p. 547-52.
126. Renkonen, R., M.N. Fukuda, L. Petrov, T. Paavonen, J. Renkonen, P. Hayry, and M. Fukuda, *A peptide mimic of selectin ligands abolishes in vivo inflammation but has no effect on the rat heart allograft survival1*. Transplantation, 2002 Jul 15. **74**(1): p. 2-6.
127. Braun-Dullaues RC, Dietrich S, Schoaff MJ, Sedding D, Leithaeuser B, Walker G, Seay U, Matthias RF, Kummer W, Tillmanns H, and H. W., *Protective effect of 3-deazaadenosine in a rat model of lipopolysaccharide-induced septic myocardial dysfunction*. Shock, 2003. **in press**.

128. Albina, J.E., S. Cui, R.B. Mateo, and J.S. Reichner, *Nitric oxide-mediated apoptosis in murine peritoneal macrophages*. J Immunol, 1993. **150**(11): p. 5080-5.
129. Szabo, C., B. Zingarelli, M. O'Connor, and A.L. Salzman, *DNA strand breakage, activation of poly(ADP-ribose) synthetase, and cellular energy depletion are involved in the cytotoxicity in macrophages and smooth muscle cells exposed to peroxynitrite*. PNAS, 1996. **93**(5): p. 1753-1758.
130. Kageyama, Y., X.K. Li, S. Suzuki, H. Suzuki, K. Suzuki, T. Kazui, and Y. Harada, *Apoptosis is involved in acute cardiac allograft rejection in rats*. Ann Thorac Surg, 1998. **65**(6): p. 1604-9.
131. Miller, L.W., D.J. Granville, J. Narula, and B.M. McManus, *Apoptosis in cardiac transplant rejection*. Cardiol Clin, 2001. **19**(1): p. 141-54.
132. Pinsky, D.J., W. Aji, M. Szabolcs, E.S. Athan, Y. Liu, Y.M. Yang, R.P. Kline, K.E. Olson, and P.J. Cannon, *Nitric oxide triggers programmed cell death (apoptosis) of adult rat ventricular myocytes in culture*. Am J Physiol, 1999. **277**(3 Pt 2): p. H1189-99.
133. Szabolcs, M.J., N. Ma, E. Athan, J. Zhong, M. Ming, R.R. Sciacca, J. Husemann, A. Albala, and P.J. Cannon, *Acute cardiac allograft rejection in nitric oxide synthase-2(-/-) and nitric oxide synthase-2(+/-) mice: effects of cellular chimeras on myocardial inflammation and cardiomyocyte damage and apoptosis*. Circulation, 2001 May 22. **103**(20): p. 2514-20.
134. Dragun, D., I. Lukitsch, S.G. Tullius, Y. Qun, J.K. Park, W. Schneider, F.C. Luft, and H. Haller, *Inhibition of intercellular adhesion molecule-1 with antisense deoxynucleotides prolongs renal isograft survival in the rat*. Kidney Int, 1998. **54**(6): p. 2113-22.
135. Mann, M.J., G.H. Gibbons, H. Hutchinson, R.S. Poston, E.G. Hoyt, R.C. Robbins, and V.J. Dzau, *Pressure-mediated oligonucleotide transfection of rat and human cardiovascular tissues*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(11): p. 6411-6.
136. Poston, R.S., M.J. Mann, E.G. Hoyt, M. Ennen, V.J. Dzau, and R.C. Robbins, *Antisense oligodeoxynucleotides prevent acute cardiac allograft rejection via a novel, nontoxic, highly efficient transfection method*. Transplantation, 1999. **68**(6): p. 825-32.
137. Mann, M.J. and V.J. Dzau, *Therapeutic applications of transcription factor decoy oligonucleotides*. J. Clin Invest 2000 Nov. **106**(9): p. 1071-5.
138. Vos, I.H., R. Govers, H.J. Grone, L. Kleij, M. Schurink, R.A. De Weger, R. Goldschmeding, and T.J. Rabelink, *NFkappaB decoy oligodeoxynucleotides reduce monocyte infiltration in renal allografts*. Faseb, J 2000 Apr. **14**(5): p. 815-22.
139. Laskin, D.L., L. Fakhrzadeh, D.E. Heck, D. Gerecke, and J.D. Laskin, *Upregulation of phosphoinositide 3-kinase and protein kinase B in alveolar macrophages following ozone inhalation. Role of NF-kappaB and STAT-1 in ozone-induced nitric oxide production and toxicity*. Mol Cell Biochem, 2002. **234-235**(1-2): p. 91-8.
140. Bories, P.N., B. Campillo, and E. Scherman, *Up-regulation of nitric oxide production by interferon-gamma in cultured peritoneal macrophages from patients with cirrhosis*. Clin Sci (Lond), 1999. **97**(4): p. 399-406.

141. Jaramillo, M., D.C. Gowda, D. Radzioch, and M. Olivier, *Hemozoin increases IFN-gamma-inducible macrophage nitric oxide generation through extracellular signal-regulated kinase- and NF-kappa B-dependent pathways*. J Immunol, 2003. **171**(8): p. 4243-53.
142. Tullius, S.G. and N.L. Tilney, *Both alloantigen-dependent and -independent factors influence chronic allograft rejection*. Transplantation, 1995. **59**(3): p. 313-8.
143. Orbaek Andersen, H., *Heart allograft vascular disease: an obliterative vascular disease in transplanted hearts*. Atherosclerosis, 1999. **142**(2): p. 243-63.
144. Takada, M., A. Chandraker, K.C. Nadeau, M.H. Sayegh, and N.L. Tilney, *The role of the B7 costimulatory pathway in experimental cold ischemia/reperfusion injury*. J Clin Invest, 1997. **100**(5): p. 1199-203.
145. Schaub, M., T.H. Stadlbauer, A. Chandraker, J.P. Vella, L.A. Turka, and M.H. Sayegh, *Comparative strategies to induce long-term graft acceptance in fully allogeneic renal versus cardiac allograft models by CD28-B7 T cell costimulatory blockade: role of thymus and spleen*. J Am Soc Nephrol, 1998. **9**(5): p. 891-8.
146. Shinde, S., Y. Wu, Y. Guo, Q. Niu, J. Xu, I. Grewal, R. Flavell, and Y. Liu, *CD40L is important for induction of, but not response to, costimulatory activity. ICAM-1 as the second costimulatory molecule rapidly up-regulated by CD40L*. J Immunol, 1996. **157**(7): p. 2764-2768.

5 Zusammenfassung

Für Patienten im Endstadium des Herzversagens hat sich die Transplantation als Therapie der Wahl etabliert und stellt sowohl eine Erhöhung der Lebensqualität als auch eine Verbesserung der Prognose dar. Um die akute Transplantatabstoßung, aber auch die chronische Transplantatdysfunktion zu verhindern, müssen die Organe so früh wie möglich vor der Schädigung durch das Immunsystem des Empfängers geschützt werden. Daher war das Ziel der Studie, Transplantat protektive Strategien zu evaluieren, welche die akute Abstoßung verhindern oder abschwächen sollen.

Die Versuche wurden an einem vollständig allogenen heterotopen Ratten-Herztransplantationsmodell vorgenommen. In diesem Modell werden WF-Spenderherzen an die großen Bauchgefäße von LEW-Ratten anastomosiert und ohne Immunsuppression werden die Transplantate innerhalb $5,7 \pm 0,5$ Tagen abgestoßen. In der Frühphase der akuten Abstoßung kommt es histologisch zur Expression von Adhäsionsmolekülen (ICAM-1 und VCAM-1) und in der Folge zur Infiltration der Transplantate mit immunkompetenten Zellen, wie T-Zellen und Monozyten/Makrophagen. Diese Abstoßungskaskade wird amplifiziert durch die Expression von Mediatoren wie IL-2 und MCP-1 auf mRNA- und Protein-Ebene. In den beiden Therapiearten der Untersuchung wurden unbehandelte Tieren den behandelten gegenüber gestellt und die Transplantate wurden an den Tagen 1,3 und 6 post Transplantationem für die weiteren histologischen, immunhistochemischen und molekularbiologischen Untersuchungen entnommen (n=4, bzw. n=5/Tag/Gruppe).

In dem ersten Teil der Untersuchungen wurden die Tiere mit der immunmodulatorischen Substanz c3Ado behandelt (2xtäglich 2,5 mg/kg KGW s.c.). Hier zeigte sich, dass durch c3Ado die Expression der beiden Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 an den Tagen 1 und 3 hoch signifikant reduziert werden konnte. Durch diese Reduktion konnte auch die Infiltration mit mononukleären Zellen (MHC II positiv) und ganz spezifisch auch die Zahl an Monozyten/Makrophagen (ED-1 positiv) und T-Zellen (R73 positiv), die in das Organ einwandern, vermindert werden. Auch die Anzahl der Zellen, die iNOS positiv waren und die damit eine erhöhte Produktion von NO vermitteln, konnte durch die c3Ado-Gabe an den Tagen 1,3 und 6 reduziert werden. Auf molekularer Ebene zeigte sich, dass die mRNA-Konzentration der Adhäsionsmoleküle nicht durch c3Ado beeinflusst wird. Daraus resultiert, dass c3Ado vermutlich posttranskriptionell die Expression der Adhäsionsmoleküle reguliert. Danach konnte

demonstriert werden, dass trotz der Reduktion der Infiltration zwei zentrale Botenstoffe der akuten Abstoßung, nämlich IL-2 und MCP-1, auf mRNA-Ebene durch c3Ado nicht moduliert wird.

Trotz der Verminderung der Infiltration durch immunkompetente Zellen konnte keine Verlängerung des Transplantatüberlebens erzielt werden. Dies könnte darin begründet sein, dass ein spezifischer Mechanismus des Zelluntergangs, die Apoptose durch c3Ado nicht unterdrückt werden konnte.

Im Gegensatz zu einem immunmodulatorischem Ansatz, der die Immunantwort des Transplantat-Empfängers reduziert, war das Ziel der zweiten Versuchsreihe, noch früher in die Mechanismen der akuten Transplantatabstoßung einzugreifen und die Antigenität des Transplantates peri-operativ zu verringern. Durch die Inhibition zweier zentraler Transkriptionsfaktoren, AP-1 und STAT-1, sollte die intrazelluläre Signaltransduktion so moduliert werden, dass es in Folge zu einer verminderten Aktivierung der Mechanismen der akuten Transplantatabstoßung kommt. Um diese zentralen Botenstoffe, die Transkriptionsfaktoren zu inhibieren, wurde die Decoy-Technologie verwandt, indem die Transplantate in der Ischämiephase intra-operativ mit STAT-1, bzw. AP-1 Decoy-ODN-Lösung perfundierten. Diesen zwei Gruppen stellten wir wieder unbehandelte, d.h. nur mit der Perfusionslösung behandelte, akut abstoßende Tiere entgegen (n=5/Tag/Gruppe). Durch die Inhibition sowohl von AP-1 als auch STAT-1 konnte das Transplantatüberleben trotz nur einmaliger lokaler Anwendung der Decoys in der Ischämiephase des Transplantates signifikant verlängert werden. Dieser Effekt ist auf die spezifische Wirkung der beiden Decoys zurückzuführen, da es nachweislich mit mutierten ODN-Strängen zu keinerlei überlebensverlängerndem Effekt kam (n=5/Tag/Gruppe). Durch Fluoreszenzmarkierung konnten wir nachweisen, dass es zu einer Anreicherung der Decoys in den Endothelzellen der Transplantate kommt. In beiden Gruppen konnte durch den Einsatz sowohl von STAT-1 als auch AP-1-Decoys die Expression des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 am Tag 1 und am Tag 3 reduziert werden. Bei dem Adhäsionsmolekül VCAM-1 kam es am Tag 1 zu einer nahezu kompletten Inhibition der Expression. Auf mRNA-Ebene zeigte sich, dass auch in dieser Studie die verminderte Expression der Adhäsionsmoleküle nicht mit einer reduzierten mRNA-Konzentration im Gesamtlisat einhergeht.

Durch die Inhibition von AP-1 als auch STAT-1 konnte zusätzlich die Anzahl der das Transplantat infiltrierenden, immunkompetenten Zellen am Tag 3 vermindert werden. Ganz spezifisch reduzierte sich die Infiltration mit Monozyten und T-Zellen signifikant

am Tag 3 post Transplantationem. Obwohl die Decoys nur einmalig perioperativ eingesetzt wurden, konnte die Infiltration mit T-Zellen bis zum 6. Tag post Transplantationem signifikant reduziert werden.

In beiden Versuchsreihen zeigte sich, dass durch die unterschiedlichen Strategien zentrale histologische Zeichen der akuten Transplantatabstoßung wie die Expression von Adhäsionsmolekülen und die folgende zelluläre Infiltration deutlich vermindert werden konnte. Diese Modulation der Mechanismen der Transplantatabstoßung in der Frühphase wurde in der zweiten Versuchsreihe durch einer Verlängerung des Transplantatüberlebens dokumentiert. Daher könnten beide Ansätze dazu dienen, neue therapeutische Ansätze zu liefern, um die kritische Zeit nach der Transplantation bis zum vollständigen Greifen der Immunsuppression zu überbrücken.

6 Summary

Solid organ transplantation has become the treatment of choice for many patients with end stage organ failure. Despite improvements in immunosuppressive therapy, acute rejection episodes occur within the first days or weeks after engraftment with a frequency of approximately 1.3 episodes per patient during the first year after transplantation and remain an important cause of post-transplant morbidity, mortality, and graft loss. Therefore the aim of the study was to investigate two different strategies to modify the pathophysiological mechanism of acute cardiac allograft rejection.

Using the WF to LEW rat cardiac allograft model, untreated grafts were rejected within 5.7 ± 0.5 days. This is a fully allogenic heterotopic heart transplantation model. In the first days after transplantation immunohistological the expression of adhesion molecules like ICAM-1 and VCAM-1 can be detected. Furthermore during the timecourse of acute allograft rejection the grafts were infiltrated with immune competent cells like for example T-cells and Macrophages.

First we investigate an immunosuppressive strategy leading to modification of the immune response of the recipient. The experimental animals therefore received 2x5mg c3Ado s.c./day (n=4, per group and time point). The aim of the second part of the study was to reduce the allogenity of the graft through the inhibition of the intracellular pathway of two transcription factors. Therefore the grafts were perfused during the transplant procedure with ODN Decoy solution (STAT-1 or AP-1 dODN solution (10 μ M)) targeting the transcription factors STAT-1 and AP-1. Buffer solution or mutated control STAT-1 and AP-1 dODN (10 μ M) received as adequate controls. Grafts were harvested on day 1, 3 and 6 after transplantation for further mechanistical examination (n=5, per group and time point).

In c3Ado treated allografts adhesion molecule (ICAM-1, VCAM-1) expression on day 1 and 3 after transplantation was almost completely abolished compared with unmodified grafts. In later time points immunohistochemical examination of c3Ado treated grafts revealed a significant reduction in infiltrating MHC II positive cells, T-cell receptor positive cells (R73) as well as ED1 positive monocytes and macrophages at day 3 and 6 after transplantation. In contrast, c3Ado treatment was neither able to prevent apoptotic cell death (TUNEL assay and DNA laddering) in the transplanted graft at day 6 after engraftment nor to prolong allograft survival.

In the second part of the study the grafts were perfused perioperativ with STAT-1 or

AP-1 ODN Decoys targeting the inhibition of the intracellular pathway of these two transcription factors. As demonstrated by fluorescence dye-labelled dODNs, exposure of the grafts to the dODN solution during 45 min of warm ischemia resulted in a dominant uptake of the dODNs by graft endothelium. AP-1 and STAT-1 dODN treatment prolonged cardiac allograft survival approximately 40% from 5.6 ± 0.5 days to 7.8 ± 1.3 days and 7.4 ± 0.5 days, respectively (Mean \pm SD, $p < 0.01$, $n = 5$ in each group). In contrast, treatment with vehicle or the control dODNs did not prolong cardiac allograft survival. Immunohistochemical examination on day 1, 3 and 6 revealed a marked reduction of infiltrating leukocytes, namely T-cells and macrophages, in the dODN-perfused grafts at day 3 post transplantation. In addition adhesion molecule expression (ICAM-1, VCAM-1) on vascular endothelial cells was markedly reduced.

Summarising these results the immunosuppressive strategy applying c3Ado systemically to the transplant recipient diminished the histological features of acute cardiac allograft rejection without preventing the reduction of apoptotic cell death nor to prolong cardiac allograft survival. In contrast, the treatment of the graft alone with dODNs targeting the activation of the transcription factors STAT-1 and AP-1 prevented the expression of adhesion molecule expression, reduced the infiltration of the allografts and prolonged cardiac allograft survival without any immunosuppressive therapy of the recipient.

The utilization of such dODNs in a cardioplegic solution might be a novel strategy to protect transplanted organs from early damage during transplantation, to preserve organ function and bridge the critical phase after transplantation when standard immunosuppression is not yet completely effective.

7 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen, die mich bei dieser Arbeit unterstützt haben, sehr herzlich bedanken.

Mein erster Dank gilt PD Dr. Hans Hölschermann und PD Dr. Rüdiger Braun-Dullaeus für die Überlassung des Themas sowie die Betreuung der Arbeit.

Besonders danke ich Herrn Prof. Dr. Rüdiger Gerstberger für die Übernahme und Vertretung dieser Dissertation in der Veterinärmedizin. Die hervorragende Betreuung und die Diskussionsbereitschaft haben wesentlich zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. Thomas Stadelbauer sowohl für die praktische und theoretische Betreuung, als auch den regelmäßigen Gedankenaustausch und die moralische Unterstützung.

Für die Unterstützung während der Laborarbeit und die herzliche Arbeitsatmosphäre gilt mein Dank Frau Behnoush Parviz, Frau Anne Staubitz und Frau Antje Weber.

Ein „Danke-schön“ auch an Daniel Schuster und Dieter Bretz für die Durchsicht der Arbeit.

Für die Unterstützung und für den Rückhalt danke ich meinen Eltern, Tinka und allen Freunden, die immer wieder aufmunternde Worte während der Entstehung dieser Dissertation gefunden haben.

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D - 3 5 3 9 6 G I E S S E N

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5085-1

